



Instituto Politécnico de Coimbra

Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Departamento de Ciências Biomédicas Laboratoriais



**Instituto Politécnico
de Coimbra**

Vitamina D em crianças e adolescentes com doença renal

Inês de Carvalho Lagoa

Coimbra

2017



Instituto Politécnico de Coimbra

Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Departamento de Ciências Biomédicas Laboratoriais



Vitamina D em crianças e adolescentes com doença renal

Dissertação apresentada à Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas e Saúde Pública – Especialização de Hematologia e Imunologia Clínico-Laboratorial, realizada sob a orientação científica do Especialista em ACSP António José dos Santos Gabriel, Professor Adjunto da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra e coorientação da Doutora Nádía Isabel Almeida Osório, equiparada a Assistente da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra.

Agradecimentos

Agradeço ao Professor António Gabriel e à Professora Nádía Osório, o empenho, esforço e dedicação que colocaram na correção deste trabalho, bem como pelas sugestões e orientação dadas. Agradeço o total apoio, disponibilidade, pelo saber que transmitiram, pelas opiniões e críticas, a colaboração prestada no solucionar de dúvidas e problemas que foram surgindo ao longo da realização deste trabalho e por todas as palavras de incentivo.

Ao Dr. Fernando Ribeiro Rodrigues um agradecimento muito especial por me ter concedido a oportunidade de realizar este trabalho no Serviço de Patologia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, EPE.

À Dra. Henriqueta Pereira, como responsável pelo laboratório do Hospital Pediátrico, à Dra. Lucília Araújo e à Dra. Isabel Albuquerque pela atenção e dispor que sempre demonstraram, bem como pelo incentivo para realizar este trabalho de investigação.

À Dra. Catarina Almeida, delegada Comercial da DiaSorin, um agradecimento especial por me ter proporcionado as condições necessárias para a elaboração desta tese com o patrocínio dos reagentes de vitamina D, e pelo contributo imprescindível na realização da parte laboratorial, que contribuíram significativamente para a aumentar a qualidade deste trabalho. Agradeço também a sua simpatia e disponibilidade.

Agradeço aos meus amigos e alguns colegas de trabalho, que não menciono os nomes pois sabem quem são, o companheirismo, a força e o apoio em certos momentos difíceis e que colaboraram na recolha e separação das amostras.

À Susana Santos, colega de mestrado o meu obrigado pelo incentivo, mesmo quando estava mais desanimada.

Por último, não menos importante e tendo consciência que sozinha nada disto teria sido possível, dirijo um agradecimento especial há minha família: aos meus filhotes Leonor e Henrique, ao meu marido Paulo. E não esquecendo os meus pais, Adriano e Fernanda, pois são modelos de coragem, pelo seu apoio incondicional, incentivo, amizade e paciência demonstrada e a sua total ajuda na superação dos obstáculos que ao longo desta caminhada foram surgindo. A Todos eles peço desculpas pelas falhas que fui tendo por força das circunstâncias. E a Todos eles dedico este trabalho!

Júri

Presidente: Doutor Armando José Cerejo Caseiro, Professor Adjunto da ESTeSC

Arguente: Doutor José António Pereira da Silva, Professor Catedrático da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Orientador: Mestre António José dos Santos Gabriel, Professor Adjunto da ESTeSC, Especialista em Análises Clínicas e Saúde Pública

Resumo

Introdução: A vitamina D é uma hormona esteroide, conhecida pelo seu papel na regulação dos níveis corporais de cálcio e fósforo e na mineralização óssea. O seu recetor ao estar presente em vários tipos celulares indica-nos que esta hormona exerce uma ação complexa e harmoniosa sobre um grande número de mediadores biológicos, vias de sinalização, tipos celulares, órgãos e sistemas. A insuficiência renal crónica é associada a uma série de distúrbios do metabolismo mineral e ósseo e acentua a diminuição da síntese da forma ativa de vitamina D, $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. Um défice de vitamina D deve ser considerado um factor de risco complexo para inúmeras patologias. É consensual que valores de $25(\text{OH})\text{D} < 20\text{ng/mL}$ se traduzem em carência significativa.

Objetivos: O objetivo do estudo foi correlacionar as duas formas de vitamina D, a vitamina $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ e a vitamina $25(\text{OH})\text{D}$ com marcadores laboratoriais da função renal, numa população pediátrica com doença renal. Pretendeu-se avaliar o défice de vitamina D e verificar a sua relação com o grau de insuficiência renal.

Material e Métodos: Entre outubro de 2014 e setembro de 2015, foram recolhidas 89 de amostras de plasma de crianças e adolescentes que recorreram ao Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra - Hospital Pediátrico. As amostras foram armazenadas para posterior doseamento da vitamina $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ e da vitamina $25(\text{OH})\text{D}$, sendo que a vitamina $25(\text{OH})\text{D}$ foi doseada em dois momentos diferentes do ano (inverno e verão). Ambas foram doseadas com recurso ao autoanalisador e kits LIAISON®, Dia-Sorin Inc. Todos os resultados obtidos foram analisados com recurso ao *software* IBM-SPSS versão 22.

Resultados: Nas 89 amostras avaliadas, a etiologia da doença renal era bastante heterogénea, sendo que as anomalias congénitas representavam a sua principal causa. Observou-se uma diminuição dos níveis de vitamina $25(\text{OH})\text{D}$ nos indivíduos em estudo, sendo mais evidente no período de inverno, e não parecendo estar relacionada com a progressão da doença renal crónica (DRC). O declínio de vitamina $25(\text{OH})\text{D}$ pareceu estar associado a um aumento da paratormona (PTH) em todos os estadios da DRC, existindo entre ambas uma correlação inversa. Por sua vez, a diminuição da taxa de filtração glomerular (TFG) pareceu estar correlacionada com os níveis de PTH mais elevados e com valores aumentados de creatinina. Não se verificou qualquer correlação entre os indivíduos que tomavam ou não suplemento de vitamina $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ e os níveis plasmáticos de vitamina $25(\text{OH})\text{D}$. Porém, os indivíduos que se encontravam numa fase mais inicial da DRC apresentavam valores de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ mais elevados, apesar de serem valores médios considerados normais.

Discussão e Conclusão: A deficiência em vitamina $25(\text{OH})\text{D}$ na população em estudo foi ao encontro do que ocorre a nível mundial. O resultado médio do doseamento de vitamina $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ foi considerado normal, no entanto em 17% das amostras, obtivemos valores abaixo de 25pg/mL , assim seria de ponderar a utilidade do seu doseamento para monitorizar a toma, nos indivíduos com IRC. A correção de níveis de vitamina D desde as idades pediátricas mais precoces poderá constituir uma das medidas mais importantes na saúde pública preventiva. As informações obtidas podem contribuir para melhorar a assistência a crianças portadoras de DR.

Palavras-chave

1,25 dihidroxivitamina D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}$), 25- hidroxivitamina D ($25(\text{OH})\text{D}$), Doença Renal

Abstract

Introduction: Vitamin D is a steroid hormone, known for its role in regulating body levels of calcium and phosphorus and bone mineralization. Its receptor being present in several cell types indicates that this hormone exerts a complex and harmonious action on a large number of biological mediators, signaling pathways, cell types, organs and systems. Chronic renal failure is associated with a variety of mineral and bone metabolism disorders and markedly decreased synthesis of the active form of vitamin D, 1,25(OH)₂D. A deficit of vitamin D should be considered a complex risk factor for numerous pathologies. It is consensual that values of 25(OH)D <20ng/mL translate into significant lack.

Objectives: The aim of the study was to correlate the two forms of vitamin D, vitamin 1,25(OH)₂D and vitamin 25(OH)D with the results of laboratory markers of renal function in pediatric population with renal disease. It is thus expected to assess the vitamin D deficiency and to verify its relationship with the degree of renal failure.

Material & Methods: Between October 2014 and September 2015, 89 samples of plasma from children and adolescents were collected from the Hospital and University Center of Coimbra - Pediatric Hospital. The samples were stored for subsequent assay of vitamin 1,25(OH)₂D and vitamin 25(OH)D, this last one was dosed in two different moments (summer and winter). Both were assayed using the LIAISON® Dia-Sorin Inc. self-analyzer and kits. All results were statistically analyzed using IBM-SPSS software version 22.

Results: In 89 samples, the etiology of renal disease is highly heterogeneous and congenital anomalies are the main cause. There was a decrease in vitamin 25(OH)D D levels in the study subjects, which is more evident in the winter period and does not appear to be related to the progression of chronic renal disease (CKD).

Decreased of vitamin 25(OH)D is associated with an increase in parathyroid hormone (PTH) at all stages of CKD, with an inverse correlation between both. In turn, the decrease in glomerular filtration rate (GFR) is correlated with higher PTH levels and with increased creatinine values. There was no correlation between individuals taking vitamin 1,25(OH)₂D supplement and plasma levels of vitamin 25(OH)D. However, individuals who are in early stage of CKD feature amounts of 1,25(OH)₂D higher, although average normal values. I

Discussion and Conclusion: The deficiency in vitamin 25(OH)D in the population studied was in line with what happens worldwide. The result of vitamin 1,25(OH)₂D on average was considered normal, however in 17% of the sample, we obtained values below 25pg/mL, we would consider the usefulness of its dosage to monitor the intake in subjects with IRC. The correction of vitamin D levels from the earliest pediatric ages may be one of the most important preventive public health measures. The information obtained can contribute to improving care for children with DR.

Keywords

1,25 dihydroxy vitamin D (1,25(OH)₂D) ,25 hydroxy vitamin D (25(OH)D), Kidney Disease

Índice

ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABELAS	VIII
ABREVIATURAS	IX
1 INTRODUÇÃO: VITAMINA D	1
1.1 Caracterização Vitamina D	1
1.2 Fontes, síntese, formas ativas e mecanismos de ativação.	2
1.3 Transporte da vitamina D	5
1.4 Recetor da vitamina D e afinidade da vitamina D pelo recetor	6
1.5 Rins, seu papel na regulação hidroeletrólítica.	9
1.6 Rins e sua importância na ativação e regulação da vitamina D	16
1.7 Doença renal e a sua influência sobre os níveis de vitamina D	19
1.8 Objetivo.....	24
2 MATERIAL E MÉTODOS	25
2.1 Marcadores laboratoriais	25
2.1.1 Doseamento da vitamina 25(OH)D	25
2.1.2 Doseamento da vitamina 1,25(OH) ₂ D	26
2.1.3 Doseamento da PTH	27
2.1.4 Outros Doseamentos	27
2.1.5 Determinação da TFG	29
2.2 Análise Estatística	29
3 RESULTADOS	30
3.1 Caracterização da população em estudo	30
3.2 Caracterização dos indivíduos quanto à DR	30
3.3 Doseamento de 25(OH)D, em dois momentos diferentes do ano	32
3.4 Doseamento de 1,25(OH) ₂ D	34
3.5 Vitamina 25(OH)D e 1,25(OH) ₂ D e a sua relação com a IRC	35
3.6 Correlação dos marcadores da função renal com a PTH e vitamina D.....	35
4 DISCUSSÃO	38
5 CONCLUSÃO.....	43
6 BIBLIOGRAFIA	44

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1:** Fórmulas estereoquímicas: (a) 5 α -colestano, com a respetiva numeração dos carbonos e a denominação dos anéis do ciclopentanoperidrofenantreno; (b) 7-deidrocolesterol (7-DHC); (c) Vitamina D₃ ou colecalciferol; (d) vitamina D₂ ou ergosterol; (e) 25-hidroxivitamina D₃ (25(OH)D₃) ou calcidiol; (f) 1,25-dihidroxivitamina D₃ (1,25(OH)₂D₃) ou calcitriol; as estruturas (e) e (f) são derivadas do colecalcifero..... **3**
- Figura 2:** Metabolismo da vitamina D..... **5**
- Figura 3:** Esquema dos domínios funcionais do VDR humano: *ligand binding/heterodimerization* é o local de ligação da 1,25(OH)₂D, (DBD) domínio de ligação do ADN, (CTE) extensão C-termina. **7**
- Figura 4:** Estrutura do nefrónio. **10**
- Figura 5:** Resumo esquemático do controle endócrino do equilíbrio hidroeletrólítico..... **16**
- Figura 6:** Regulação do metabolismo da vitamina D a nível renal..... **18**
- Figura 7:** Relação do valor da vitamina 25(OH)D entre os períodos de inverno e de verão (A- Box-plot para 2 momentos de amostragem e B- *Scatter* do período de verão versus período de inverno)..... **33**
- Figura 8:** Comparação de médias e desvios padrão entre os grupos de indivíduos que tomam ou não suplementação de vitamina 1,25(OH)₂D. **34**
- Figura 9:** *Box-plot* dos níveis de PTH onde se pode observar a existência de *outliers* Apenas foram desprezados os valores superiores a 300pg/mL. **36**
- Figura 10:** *Scatter* da relação entre PTH e vitamina 25(OH)D: onde se verificou uma correlação inversa, entre ambas. Para o período de verão verificou-se uma correlação fraca ($r=-0,359$ para $p< 0.01$) entre PTH e a vitamina 25(OH)D. e no inverno a correlação sendo, também indireta, foi moderada ($r=-0,424$ para $p< 0.004$). (A- *scatter* referente ao período de inverno e B-*scatter* referente ao período de verão). **37**

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 Classificação para a DRC. Adaptado da <i>KDOQI guideline</i> , 2013	21
Tabela 2 Características gerais dos indivíduos que fazem parte do estudo.....	30
Tabela 3 Distribuição da população por etiologia da DR, suplementação com vitamina 1,25(OH)D e tratamento com diálise.	31
Tabela 4 Distribuição da população por estadio da IRC de acordo com o valor da TFG, segundo as <i>guidelines</i> da <i>KDOQI</i> . Na TFG, o valor em falta corresponde a indivíduo em cadeiras de rodas, o qual não se obteve os dados antropométricos, para efetuar o cálculo da TFG.....	31
Tabela 5 Tabela de análise descritiva dos doseamentos laboratoriais.	32
Tabela 6 Tabela dos doseamentos de 25(OH)D, em dois momentos diferentes do ano ..	33

ABREVIATURAS

1,25(OH)₂D - 1,25-dihidroxitamina D ou calcitriol

24-hidroxiase - 25-hidroxitamina D-24-hidroxiase

25(OH)D - 25-hidroxitamina D ou calcidiol

7-DHC - 7-dehidrocolesterol

ACTH - hormona adenocorticotrófica

ADH - hormona antidiurética

ADN - Ácido desoxirribonucleico

AMPc - adenosina monofosfato cíclico

CHUC-HP - Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, E.P.E. pólo Hospital
Pediátrico

CYP27B1- 1- α -hidroxiase

DCV - doença cardiovascular

DM - diabetes melitos

DR – doença renal

DRC -Doença renal crónica

EPO - eritropoietina

FGF-23 - fator 23 de crescimento fibroblástico

H⁺ - ião hidrogénio

HCO₃⁻ - ião bicarbonato

IRA – Insuficiência renal aguda

IRC - insuficiência renal crónica

KDOQI *guidelines* - *National Kidney foundation's Kidney Disease Outcomes
Quality Initiative*

Na⁺ - ião sódio

NADPH - fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida

NCoA-62 - nuclear recetor coactivador 62kD

NcoR - recetor nuclear correpressor

PK - proteína cinase

PK-C-proteína cinase C

PMH - por milhão de habitantes

PTH – paratormona

PTVD - proteína transportadora da vitamina D

RNAm - Ácido ribonucleico mensageiro

RXR - recetor X do ácido retinóico

SI - Sistema Internacional

SMRT - *silent mediator for retinoid e thyroid hormone receptors*

SRA - sistema renina-angiotensina

SRC - *steroid receptor coativador*

TFG - taxa de filtração glomerular

TRPV- recetores de potencial transitório

UVB - radiação ultra violeta B

VDR – recetor de vitamina D

1 INTRODUÇÃO: VITAMINA D

1.1 Caracterização Vitamina D

A vitamina D é na realidade uma hormona esteroide com uma ação pleiotrópica na maioria dos tecidos e células do organismo (1-3). Apesar da sua designação é fácil entender quais as razões para não ser considerada uma verdadeira vitamina: a exposição moderada à radiação ultravioleta B (UVB) leva à sua produção em quantidades adequadas, não tornando o seu aporte alimentar imprescindível; quando produzida num determinado tecido, circula pelo organismo na corrente sanguínea afetando diversos órgãos e tecidos, comportando-se como uma hormona; as enzimas necessárias para a sua ativação são expressas em diferentes tipos de células, além do fígado e rim; constituindo a sua síntese um sistema de regulação autócrino e parácrino (1, 4).

Classicamente, é conhecida pelo seu importante papel na regulação dos níveis corporais de cálcio e fósforo e na mineralização óssea, aumentando a captação intestinal, minimizando a perda renal e estimulando a reabsorção óssea, quando necessário. Foi recentemente, reconhecida também pelo seu papel importante em diversas patologias e processos fisiopatológicos, tais como a diabetes melitos (DM), doenças autoimunes e imunossupressão, doenças neurodegenerativas, inflamação, doenças cardiovasculares, hipertensão, diferentes tipos de cancro (pele, próstata, cólon, mama e sangue), entre outros (5-10).

O termo vitamina D engloba um grupo de moléculas esteroides resultante da abertura do anel com adição de dois átomos de hidrogénio em cada grupo terminal derivadas do 7-deidrocolesterol (7-DHC), interligadas através de uma cascata de reações fotolíticas e enzimáticas que acontecem em células de diferentes tecidos, sendo o rim o principal local onde essas reações ocorrem (3, 4).

1.2 Fontes, síntese, formas ativas e mecanismos de ativação.

A maior fonte de vitamina D para os humanos é resultante de produção endógena após exposição à luz solar, sendo que apenas 10% da vitamina D necessária à adequada função do organismo humano é proveniente da dieta (2). Apenas alguns alimentos são fonte significativa de vitamina D, como é o caso do óleo de fígado de bacalhau, peixes de águas frias (sardinhas, arenque, atum, salmão), alguns fungos comestíveis, gema de ovo, leite e manteiga. Mas, a nível mundial, vários alimentos são, atualmente, enriquecidos com vitamina D além de existir uma enorme variedade de suplementos de vitamina D disponíveis (2, 11).

As principais formas precursoras da vitamina D são a vitamina D₂ (ou ergocalciferol) e a vitamina D₃ (ou colecalciferol), que diferem entre si apenas pela ligação dupla, adicional e um grupo metil incorporado à longa cadeia lateral da forma biológica denominada vitamina D₂ (12). A vitamina D₂ provem de alguns vegetais, leveduras e cogumelos e é produzida pela ação da luz ultravioleta no ergosterol, esterol da membrana presente em fungos e invertebrados. A vitamina D₃ é sintetizada na pele da maioria dos animais vertebrados, incluído o homem, durante a exposição à radiação UVB da luz solar (na faixa de 290 a 315 nm) em que ocorre a conversão fotolítica do 7-DHC a pré-vitamina D₃ (4, 12, 13). A síntese endógena da vitamina D₃ inicia-se na pele, nas camadas profundas da epiderme (estrato espinhoso e basal), onde está armazenada a substância precursora, o 7-DHC, a qual absorve a radiação UVB, (2, 12). Esta absorção de energia promove a quebra fotolítica da ligação entre os carbonos 9 e 10 do anel B do ciclo-pentanoperidrofenantreno, formando uma molécula secosteróide. Esta nova substância, a pré-vitamina D₃, é termoinstável e sofre uma reação de isomerização induzida pelo calor, assumindo uma configuração espacial mais estável sendo rapidamente convertida a vitamina D₃. A energia desta nova conformação faz com que esta seja libertada para o espaço extracelular (14). Com a exposição solar contínua ocorre a conversão da pré-vitamina D₃ em metabolitos biologicamente inativos, o lumisterol e o taquisterol, não se verificando por isso, níveis tóxicos de vitamina D₃ e em caso de diminuição da vitamina esses metabolitos convertem-se de novo em pré-vitamina D₃ (15).

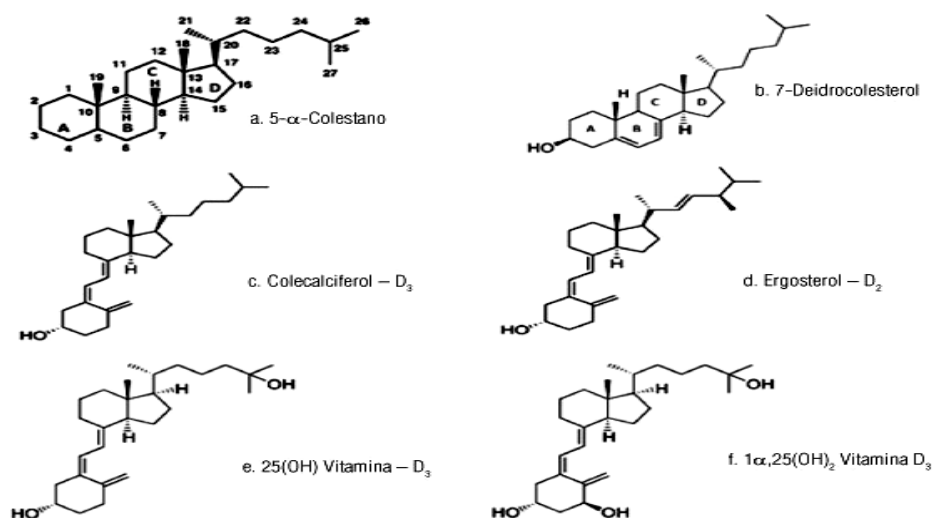


Figura 1: Estruturas estereoquímicas dos principais metabolitos: (a) 5 α -colestano, com a respetiva numeração dos carbonos e a denominação dos anéis do ciclopentanoperidrofenantreno; (b) 7-deidrocolesterol (7-DHC); (c) Vitamina D₃ ou colecalciferol; (d) vitamina D₂ ou ergosterol; (e) 25-hidroxivitamina D₃ (25(OH)D₃) ou calcidiol; (f) 1,25-dihidroxivitamina D₃ (1,25(OH)₂D₃) ou calcitriol; as estruturas (e) e (f) são derivadas do colecalciferol. Adaptado de Castro, 2011 (16).

O termo genérico vitamina D, utilizado posteriormente, compreenderá tanto a vitamina D₂ como a vitamina D₃, visto que ambas se metabolizam originando a vitamina D.

Dentro dos fatores que afetam negativamente a produção endógena de vitamina D incluem-se variações na exposição solar devido à latitude, à estação do ano e hora do dia, a componentes atmosféricos, à roupa, ao uso de protetor solar e pigmentação da pele, assim como a etnia, a idade, a obesidade e a incidência de algumas doenças crónicas (2, 12, 13, 17).

A vitamina D proveniente do aporte alimentar, é então absorvida no intestino, incorporada em quilomicrons e transportadas pelo sistema linfático até a circulação sanguínea. Quando produzida na pele, liga-se em circulação à proteína transportadora da vitamina D (PTVD), que é uma α 1-globulina, e rapidamente chega ao fígado onde irá sofrer hidroxilação no carbono 25, mediada por enzimas

da superfamília do citocromo P-450 (enzimas microsossomais: CYP2R1, CYP2J2, CYP3A4, e mitocondrial CYP27A1) (5, 18, 19). Desta modificação enzimática resulta 25-hidroxitamina D ou calcidiol (25(OH)D) que é a forma circulante de vitamina D mais abundante e constitui a sua forma de reserva no tecido adiposo (12, 20).

Das enzimas hepáticas, que cumprem também funções de 25-hidroxilase, a enzima CYP2R1 é a enzima chave deste processo, porém a mutação homozigótica no seu gene apresenta sinais clínicos e bioquímicos de deficiência de vitamina D (21). A CYP2R1 é uma enzima microsossomal, expressa predominantemente no fígado, mas também está presente nas células testiculares (12, 15, 19).

É a nível renal, nos túbulos proximais que se forma o metabolito ativo a partir da 25(OH)D através da 1- α -hidroxilase (CYP27B1), enzima mitocondrial da família dos citocromos P-450, que hidroxila o carbono 1 da 25(OH)D, formando a 1,25-dihidroxitamina D (1,25(OH)₂D) ou calcitriol (figura 2), molécula metabolicamente mais ativa com uma concentração plasmática, aproximadamente, mil vezes inferior à do seu precursor (4, 15).

O rim é o local de maior síntese de 1,25(OH)₂D, mas não o único. Outros tecidos também expressam CYP27B1, como por exemplo as células da pele, do pâncreas, da próstata, da mama, do coração, das várias glândulas endócrinas assim como no sistema imunitário (monócito, macrófago, linfócitos B e T e células dendríticas) e nos osteoclastos e condrócitos (12, 19). Daí que a comunidade científica tenha mostrado um grande interesse pela vitamina D, evidenciado pelo expressivo número de estudos, apresentados nas últimas décadas, sobre aspetos moleculares da fisiologia da vitamina D, seu impacto nos distúrbios do sistema hormonal e na saúde global dos indivíduos (7, 22-29).

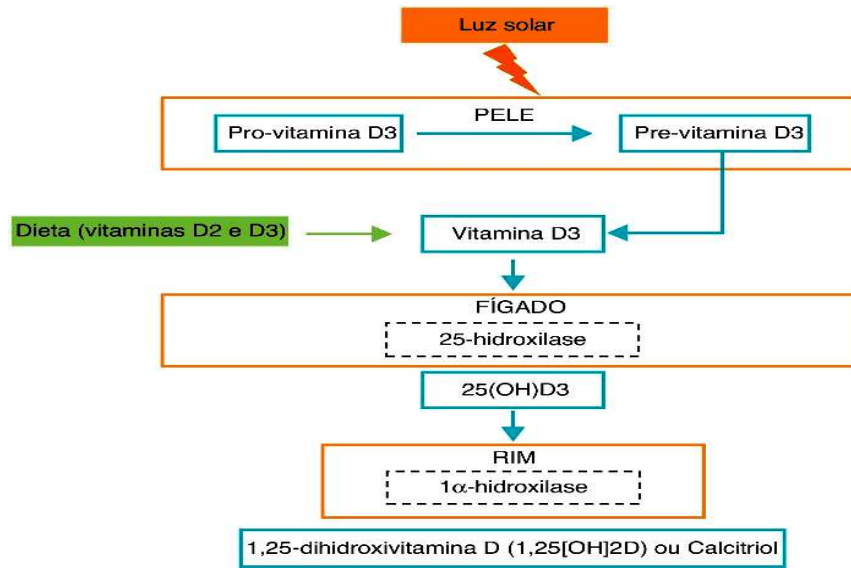


Figura 2: Metabolismo da vitamina D. Adaptado de Alves M, et al., 2013 (30).

1.3 Transporte da vitamina D

Os metabolitos da vitamina D são moléculas lipofílicas que têm de ser transportadas na circulação sanguínea acopladas a proteínas plasmáticas. A mais importante destas proteínas é a PTVD, que tem maior afinidade pela 25(OH)D do que pela 1,25(OH)₂D (12, 31, 32). Apesar da maior afinidade da PTVD do que outras proteínas de transporte, contudo devido à elevada concentração plasmática da albumina, parte dos metabolitos de vitamina D (10-15%) são também transportados por esta, enquanto apenas cerca de 1% da vitamina D circulante existe em forma livre, não estando acoplada a nenhum transportador (33).

A PTVD é uma α 1-globulina, produzida pelo fígado e eliminada pelo rim, com várias funções importantes para além de transporte da vitamina D, inclui depuração da actina, modulação da resposta imune (fator ativador de macrófagos) e inflamatória (quimiotaxia), transporte de ácidos gordos e controlo do desenvolvimento ósseo (31).

A 25(OH)D é transportada até ao rim pela PTVD, devido ao baixo peso molecular desta (28 KDa), esta é livremente filtrada nos glomérulos. A megalina, uma proteína transmembranar pertencente à família de receptores lipoproteicos de baixa

densidade (34, 35), atua como recetor celular para a PTVD, resultando na endocitose da 25(OH)D pelas células epiteliais tubulares de superfície, sendo depois reabsorvida na superfície apical das células do túbulo proximal, em conjunto com outras moléculas, incluindo a paratormona (PTH) (32, 35). A cubilina é outro recetor de superfície para a PTVD presente no túbulo proximal (35).

A concentração plasmática da PTVD, em comparação com o seu principal ligando, a 25(OH)D, é mais elevada mas, ao contrário da 25(OH)D que tem uma semi-vida de 12 dias, a PTVD tem uma semi-vida mais curta 2,5 dias. A sua elevada concentração plasmática pode ser um importante meio de proteção contra toxicidade por excesso de vitamina D (31), funcionando como seu reservatório e ao mesmo tempo regulando a sua biodisponibilidade imediata para os tecidos alvo (4).

O mecanismo pelo qual os ligantes são libertados das proteínas de transporte e são adquiridas pelas células alvo é crucial para as vias de sinalização das hormonas esteróides. Isto é particularmente importante, no caso da vitamina D, uma vez que existem cada vez mais evidências da existência extra-renal da conversão da pró-hormona 25(OH)D na sua forma ativa, a 1,25(OH)₂D (4, 36, 37). Neste cenário a vitamina D será muito dependente da expressão específica no tecido de enzimas de ativação (CYP27B1) e do recetor nuclear para a 1,25(OH)₂D, o recetor de vitamina D (VDR) (12, 15, 32).

1.4 Recetor da vitamina D e afinidade da vitamina D pelo recetor

A atividade genómica da 1,25(OH)₂D é mediada por um recetor de alta afinidade, denominado de VDR (12). Fator de transcrição e membro da superfamília dos recetores nucleares das hormonas esteróides, expresso em quase todas as células humanas que parece participar, de maneira direta ou indireta, na regulação de cerca de 3% do genoma humano (12, 38, 39). Entre as poucas células que não o apresentam, estão os glóbulos vermelhos, células musculares lisas e esqueléticas e

algumas células altamente diferenciadas do sistema nervoso central, como as células de Purkinje (40).

As células do epitélio intestinal e os osteoclastos representam os locais principais da sua expressão. Aí o recetor medeia a ação da $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ para promover absorção intestinal de cálcio e fósforo e contribuir na remodelação mineral do esqueleto, respetivamente (41). Sendo a sua principal ação a homeostasia do cálcio e fósforo, a presença em diversos tecidos, sugere a sua participação noutros processos fisiológicos para além da atividade específica sobre o metabolismo mineral e prevenção do raquitismo/osteomalácia, como seja a regulação da expressão de proteínas envolvidas na resposta celular, produzindo, assim, múltiplas respostas biológicas (12, 42, 43).

Como outros recetores nucleares, o VDR atua como ligando ativador do fator de transcrição; age por héterodimerização com umas das três isoformas do recetor X do ácido retinóico (RXR), resultando num complexo heterodímero com a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (39, 44). Assim, a sua estrutura, apresenta domínios específicos para se acoplar com a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, e com o RXR, domínios de ligação ao ADN e domínios de ativação da transcrição (38, 45) (figura 3).

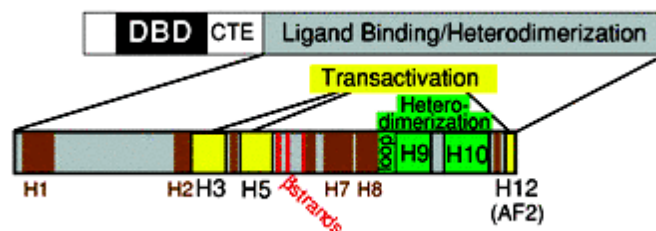


Figura 3: Esquema dos domínios funcionais do VDR humano: *ligand binding/heterodimerization* é o local de ligação da $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, domínio de ligação do ADN (DBD), extensão C-terminal (CTE). Adaptado de Haussler M., et. al., 2013 (46).

Para promover a ativação ou a repressão genómica, o heterodímero recruta complexos de proteínas correguladoras (4). Moléculas coativadoras, como alguns

steroid receptor coativador (SRC) e o *nuclear receptor coactivator* 62kD (NCoA-62) e correpressores como o *nuclear receptor correpressor* (NcoR) e *silent mediator for retinoid e thyroid hormone receptors* (SMRT) do VDR, que permitem a ligação entre o recetor e a maquinaria de transcrição de genes seguida da síntese de RNAm para várias proteínas (38, 46). Algumas que executam as funções tradicionais da vitamina D e que contribuem para a estimulação da absorção intestinal de cálcio e fósforo de modo a assegurar a homeostase óssea e mineral, como é o caso da calbindina (proteína de ligação ao cálcio), e um outro exemplo é a osteocalcina, segregada pelos osteoblastos, que determinam a remodelação e o crescimento ósseo (41, 47).

Além da resposta genómica a 1,25(OH)₂D, como outras hormonas esteróides, pode agir de uma forma rápida (1-2 minutos a 15-45 minutos) sem envolver alterações na expressão génica, isto contrasta com a resposta genómica, que normalmente demora algumas horas a dias para ser plenamente demonstrada, e pode ser bloqueada por inibidores de transcrição e de tradução (43). Atualmente, há evidência de que, além dos recetores nucleares clássicos, existem VDRs ligados à membrana celular (16, 43, 44, 48) que são responsáveis pela resposta rápida não genómica. Nesta resposta a sinalização celular pode acontecer através da modulação de fluxos iónicos e geração de segundos mensageiros (adenosina monofosfato cíclico (AMPC) e proteína cinase C (PK-C) e na indução de canais iónicos transmembranares dependentes da alteração de voltagem (44, 46, 49). Assim, a ação não genómica dominante, mas não exclusiva, do VDR-1,25(OH)₂D é promover a absorção do cálcio a nível intestinal, especialmente quando o cálcio proveniente da dieta é limitado (44).

A confirmação da estrutura e função do VDR constitui a base da versatilidade fisiológica da vitamina D e atribuiu-lhe o estatuto de hormona, abrindo uma nova era na investigação dos mecanismos moleculares de expressão genética (1). E a ocorrência de polimorfismos nos genes do VDR indicam, ser também um fator determinante das diferentes respostas à 1,25(OH)₂D como a resistência à vitamina D (4, 12, 50).

1.5 Rins, seu papel na regulação hidroeletrólítica.

A função renal é vital dado que os rins têm como principal função biológica manter a homeostasia mineral e regular o ambiente interno (49).

O rim exerce funções bioquímicas e homeostáticas. Dentro das funções bioquímicas encontramos a produção de eritropoietina, renina, $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, síntese de glicose (gliconeogénese), amónia e metabolismo de algumas substâncias (insulina por exemplo) e a produção de substâncias bioativas (são exemplo as prostaglandinas, adenosina, endotelina, factor de crescimento epidérmico e o óxido nítrico). Por sua vez, as suas funções homeostáticas incluem a regulação da osmolalidade sanguínea, regulação do equilíbrio ácido-base contribuindo para a regulação do pH sanguíneo; excreção de metabolitos como a ureia, ácido úrico e a creatinina; regulação do volume plasmático e do equilíbrio hidroeletrólítico bem como a manutenção do equilíbrio eletrólítico (51, 52).

O nefrónio é a unidade funcional e de filtração do rim. Cada um é constituído por um glomérulo e por um túbulo associado, diferenciado em várias porções: cápsula de Bowman, túbulo proximal, ansa de Henle, túbulo contornado distal e ducto coletor (figura 4) (51, 53).

Existem dois tipos principais de nefrónios, os nefrónios corticais (cujos glomérulos se situam no córtex externo em que as ansas de Henle são pequenas) e os justaglomerulares (cerca de 30-40% e os seus glomérulos localizam-se no córtex perto da medula e tem ansas de Henle longas que penetram a medula) (51).

A regulação do meio interno, pelo rim, é composta por quatro processos: filtração do plasma sanguíneo pelos glomérulos, reabsorção seletiva pelos túbulos, secreção pelos mesmos e troca de iões de hidrogénio (H^+) e produção de amónia que funciona como tampão (54).

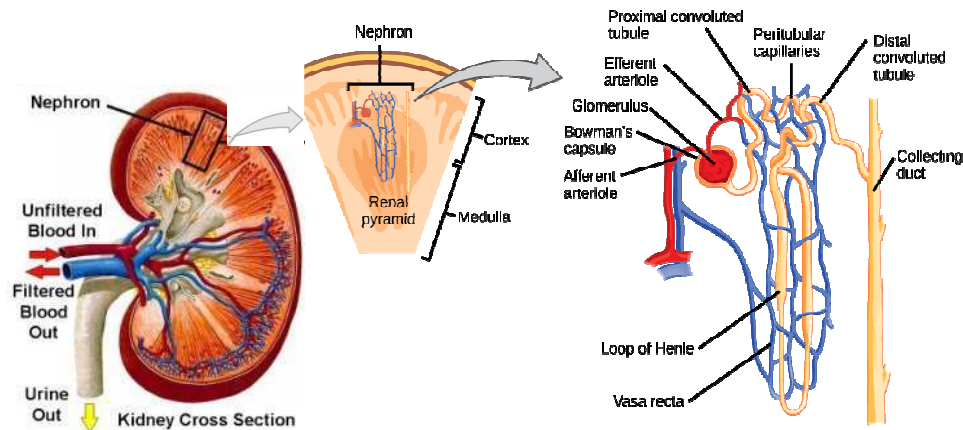


FIGURA 4: Estrutura do nefrônio, adaptado de OpenStax, 2012 (55).

Nos glomérulos são retidas as células sanguíneas assim como, as proteínas de grande tamanho, o restante segue na cápsula de Bowman até ao túbulo proximal, onde a glicose e os hidratos de carbono, ácidos gordos essenciais, proteínas e aminoácidos, vitaminas e minerais sofrem um processo de reabsorção ativo, e também ocorre reabsorção passiva de água e minerais o que faz com que em condições normais nenhum destes elementos passe para o túbulo proximal. Este túbulo acaba na ansa de Henle e esta, por sua vez, termina no túbulo distal. Como já quase todas as substâncias úteis foram reabsorvidas, apenas a água, o sódio e outros minerais, além de elementos tóxicos, ureia, ácido úrico e creatinina, chegam à ansa de Henle (56, 57). A reabsorção de água na ansa de Henle e no túbulo distal está diretamente relacionada com a quantidade de urina e com a diurese (44, 57).

A resposta reflexa de controlo de absorção-excreção de água e eletrólitos é dependente da libertação de hormonas: a hormona adrenocorticotrófica (ACTH) e a hormona antidiurética (ADH); e da sensação de sede. Estes, por sua vez, sofrem um controlo central através do núcleo ventrimedial do hipotálamo e do córtex cerebral que reconhecem situações de hipernatremia através de neurónios especializados (58).

Porém, o sistema renina-angiotensina (SRA) em conjunto com aldosterona é o grande responsável pela regulação do equilíbrio hidroeletrolítico, visto que promove efeitos fisiológicos importantes para o metabolismo hidrossalino (59).

O SRA é desencadeado, primariamente, por dois estímulos: por diminuição do fluxo sanguíneo na arteríola aferente renal, que pode ser devida a diminuição do volume sanguíneo intravascular (hipovolémia), ou diminuição da osmolalidade plasmática, devida a uma hiponatremia (59).

Equilíbrio Hídrico

A água tem um importante papel tanto a nível estrutural como funcional de todos os órgãos. Assim, manter-se o seu volume relativamente constante, bem como uma estável composição de solutos dos líquidos corporais é essencial para a homeostasia e tonicidade (60).

A água está distribuída em dois grandes compartimentos no organismo. Um é o compartimento intracelular, que corresponde a 55-75% de água corporal em função da idade. O outro é o compartimento extracelular que contém 25-45% da água corporal total, distribuída pelo líquido intersticial (3/4 do líquido extracelular) e o plasma (1/4 do líquido extracelular). A distribuição da água não sofre grandes variações graças a um controlo apertado da osmolalidade que se mantém as proporções em cada um dos compartimentos (61).

O balanço hídrico é determinado pela ingestão de água (água ingerida e água contida nos alimentos) e pela sua eliminação (urina, fezes, suor e ar expirados pelos pulmões), qualquer falha nestes mecanismos com conseqüente alteração deste balanço constitui um risco para a vida (58, 60).

Fisiologicamente a água contida no corpo humano provém do exterior, pela ingestão de líquidos e alimentos, mas também se produz no seu interior. O principal estímulo de regulação de ingestão é a sensação de sede, que surge com o aumento da osmolalidade (> a 295mOsm/kg), principalmente à custa do ião sódio (54, 61).

A sua produção corporal interna resulta das oxidações biológicas (síntese de proteínas, cadeia respiratória, etc.) e representa cerca de 10% da quantidade de água necessária ao organismo (60).

Relativamente às perdas de água, existem três formas de eliminação não dependente do seu conteúdo nem dos solutos: perdas pela pele condicionadas pela temperatura corporal e pela temperatura ambiente; perdas respiratórias que dependem da humidade exterior; e as fezes, que são perdas mais ou menos constantes. A outra via de eliminação de água é a produção de urina, sendo os rins os principais órgãos reguladores do equilíbrio entre as entradas e as perdas, em conjunto com a sede (57, 60).

O rim permite uma estabilidade no volume de líquido contido no organismo e uma estabilidade na concentração de solutos, com variações inferiores a 2%. O líquido intracelular é composto principalmente pelos cations de potássio (K^+), cálcio e magnésio e por anions de fosfatos e proteínas. Por sua vez o Na^+ é o principal cation do líquido extracelular enquanto o cloro e o bicarbonato (HCO_3^-) representam os principais anions (58, 62).

O principal controlo sobre a eliminação de água na urina é da responsabilidade da ADH também designada de arginina vasopressina. A sua dupla denominação deve-se aos seus dois principais efeitos: efeito antidiurético (via recetor V2) ou efeito vasoconstritor (via recetor V1) dependendo da sua concentração plasmáticas baixas ou altas respetivamente (58).

A ADH humana é um péptido cíclico formado por oito aminoácidos sintetizado por neurónios dos núcleos supra-óptico e paraventricular do hipotálamo, é armazenada nos terminais axonais ao nível da hipófise e depois libertada na corrente sanguínea. A sua libertação é controlada por osmorreceptores (presentes no hipotálamo) e por barorreceptores periféricos (63). Um aumento da osmolalidade efetiva (condicionada pelos ions cloro e sódio) acima de 280-290 mOsm/kg de líquido provoca um aumento dos níveis plasmáticos da ADH (62). A sede é estimulada a osmolalidades superiores como segunda linha de defesa contra a hiperosmolalidade (57, 64).

Uma vez libertado na corrente sanguínea, a ADH exerce sua ação antidiurética ao nível renal nos ductos coletores, ligando-se ao recetor V2 presente na membrana basolateral, conduz à formação do AMPc intracelular que ativa a PK-A que condiciona a produção de canais de água, aquaporinas tipo 2 (56, 65). Estas aquaporinas localizam-se na membrana apical das células principais do túbulo

coletor aumentando assim a sua permeabilidade à água (63, 65). A diminuição da osmolalidade plasmática abaixo de 280 mOsm/kg de líquido inibe a secreção da ADH, levando a uma diminuição dos canais permeáveis à água nos ductos coletores renais (64).

A ADH também provoca uma redução no fluxo urinário e aumento da osmolalidade da urina, fazendo a ligação entre a osmolalidade plasmática e urinária (64).

Equilíbrio Eletrolítico

Entre as funções importantes que os rins exercem para o bom funcionamento do organismo estão vários processos para o controlo do equilíbrio ácido-base: troca de H^+ com Na^+ , excreção de amónia (NH_4^+) na urina e reabsorção de HCO_3^- (56). Este controlo é necessário para a manutenção do pH sanguíneo, pois o pH determina o estado de carga das proteínas, afetando a sua conformação espacial, atividade enzimática, transporte celular e todas as suas importantes funções metabólicas (56).

De facto nos túbulos renais o HCO_3^- e o Na^+ entre outros iões são absorvidos, sendo o H^+ excretado na urina, por um processo de transporte ativo. A reabsorção do HCO_3^- é dependente da secreção de H^+ , e ocorre em todos os segmentos tubulares, mas cerca de 85% deste é reabsorvido no túbulo proximal e principalmente na sua primeira metade. Por sua vez, o NH_3 proveniente da desaminação dos aminoácidos (40%), juntamente com o que é proveniente da ação da glutaminase sobre a glutamina (60%), conjuga-se com o H^+ formando NH_4^+ que se combina os aniões, principalmente com o cloro, sendo excretada pela urina. Todos estes mecanismos contribuem de forma eficaz para a manutenção do pH (56).

A excreção de K^+ em excesso no filtrado é outra função importante do rim para manter a homeostasia. O K^+ é um dos principais catiões do organismo, e deve ser mantido em elevadas concentração no espaço intracelular e em baixas concentrações no fluido extracelular, de modo a permitir tanto o normal funcionamento celular, como o gradiente exigido para a excitação nervosa e contração muscular (56). O rim desempenha o seu papel excretando a maioria no

túbulo proximal e uma secreção variável no túbulo distal, com a ajuda da aldosterona (62).

O SRA é um importante regulador da pressão arterial e da homeostasia eletrolítica renal, diretamente ou pela modulação da liberação da aldosterona (62). No caso de hiperkaliémia e hipovolémia, em conjunto ou isoladamente, proporcionam a queda da filtração renal, o que diminuirá a passagem do sangue pelos nefrônios. As células justaglomerulares do córtex renal detetam estas condições de baixa taxa de filtração renal e induzem a produção e liberação de renina para a circulação (59).

A renina é uma aspartil protéase, que tem por função converter um substrato plasmático inativo, sintetizada pelo fígado o angiotensinogénio (uma α 2-globulina de aproximadamente 400 aminoácidos) em angiotensina I (decapeptídeo). A angiotensina I possui baixa atividade biológica e pela ação de uma glicoproteína sintetizada nos pulmões e células endoteliais, a enzima conversora de angiotensina, que remove o dipeptídeo de histidina-leucina da porção terminal C da angiotensina I, convertendo-o em angiotensina II (octapeptídeo) (62, 66). A angiotensina II é o principal peptídeo efetor do SRA, é a maior reguladora do equilíbrio hemodinâmico e da homeostasia de líquidos e do Na^+ e participando, também, no crescimento celular e do processo de remodelação cardiovascular (67).

A angiotensina II promove quatro efeitos fisiológicos básicos e fundamentais que contribuem em conjunto para o equilíbrio hidroeletrólítico: vasoconstrição (angiotensina II é a substância vasoativa mais potente que se conhece, provoca hipertensão arterial e inibe a síntese de renina), estímulo da hipófise (para liberação de ADH), estímulo do córtex cerebral (induz a sensação consciente da sede) e estímulo do córtex adrenal (para a síntese de aldosterona que promove a reabsorção de Na^+ e a excreção tubular de K^+ para contrabalançar o aporte de água provocado pela ADH e a que é ingerida para saciar a sede) (62, 68). Estas ações permitem reverter a hiperkaliémia e a hipovolémia iniciais, induzindo o retorno das condições fisiológicas (66).

Mais recentemente, a angiotensina II foi associada à geração de radicais oxidativos como o óxido nítrico e parece estar envolvida no processo inflamatório, aterosclerose e envelhecimento vascular (68).

A angiotensina II estimula a secreção da aldosterona no córtex supra-renal. Esta é uma hormona mineralocorticóide secretada pela zona glomerulosa das glândulas adrenais para além de ser um potente modulador da reabsorção de Na^+ no túbulo distal, particularmente quando há a necessidade de conservar este ião, amplifica as ações da angiotensina II induzindo a remodelação e inflamação vascular (58). A sua secreção é regulada pelo próprio SRA e pelo K^+ .

O rim tem um papel importante na manutenção do ião cálcio, tanto a nível extracelular como nos níveis de reserva, necessários para o normal funcionamento intracelular e manutenção do esqueleto, alcançado com um controlo integrado pela PTH e pela $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (69). O cálcio é absorvido no túbulo proximal e ramo ascendente e túbulo contornado distal, por um processo de transporte ativo análogo ao processo de absorção de cálcio duodenal induzido pela $\text{VDR}-1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (46).

Em resumo, o controlo do equilíbrio hidro-eletrolítico renal, pela formação de urina, é conseguido por dois mecanismos principais que interagem para manter a homeostasia corporal: a retenção de água livre de solutos via ADH e retenção de Na^+ via SRA (70).

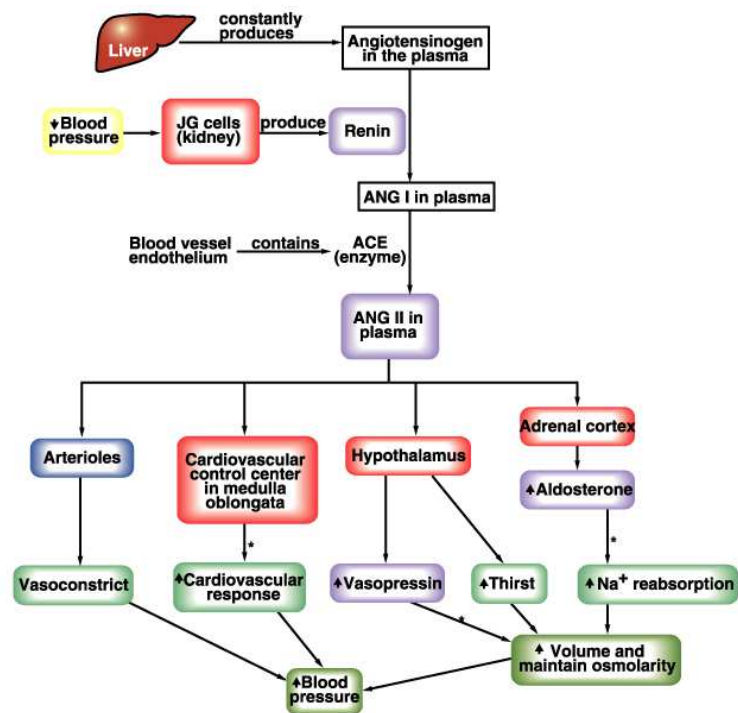


Figura 5: Resumo esquemático do controle endócrino do equilíbrio hidroeletrólítico. Adaptado de Silverthorn 2016 (71).

1.6 Rins e sua importância na ativação e regulação da vitamina D

A hidroxilação da 25(OH)D por ação de uma enzima dependente do citocromo P-450, a CYP27B, ocorre principalmente nas mitocôndrias das células dos túbulos proximais do rim, onde se transferem elétrons do NADPH para a CYP27B, e seguidamente, na presença de oxigênio, há a conversão da 25(OH)D em 1,25(OH)₂D e água (12, 19, 49).

Esta reação é o processo chave para a ativação da vitamina D, que posteriormente se ligará com alta afinidade ao VDR, presente em abundância no túbulo distal e em menor grau no túbulo proximal (32, 49). A atividade enzimática, no rim é estritamente regulada pela PTH, cálcio, fósforo, 1,25(OH)₂D e pelo fator de crescimento fibroblástico-23 (FGF-23) e é também dependente da ação da megalina (14, 32, 72).

A PTH estimula a expressão renal da CYP27B1 favorecendo deste modo a produção de 1,25(OH)₂D, que por sua vez irá atuar no intestino para promover

absorção de cálcio e fósforo, no rim para promover o aumento da absorção tubular de cálcio e contribuindo diretamente na reabsorção óssea (12, 15, 34). Assim, a CYP27B1 renal é induzida pela PTH, aquando uma diminuição das concentrações de cálcio, sofre um *feedback* negativo por parte da 1,25(OH)₂D e do FGF-23 (12, 15, 46).

O FGF-23 necessita de se ligar a diferentes recetores para mediar a repressão da CYP27B1 e inibir o cotransportador de sódio e fósforo. Contudo, os seus recetores requerem um correceptor, a proteína *klotho* (15, 46). Esta proteína membrana é produzida sobretudo no túbulo distal, e é essencial na mediação da atividade FGF-23, inibe a atividade da CYP27B1 e regula a produção 1,25(OH)₂D (15, 49).

Uma diminuição da ingestão de fósforo na dieta, resulta numa hipofosfatémia, estimula a produção renal de 1,25(OH)₂D por regulação positiva do gene da CYP27B1, e este efeito é independente da concentração plasmática da PTH. A ingestão de fósforo e a sua concentração plasmática são determinantes para a concentração do FGF-23, e este é, por si só, um potente regulador do fósforo e do metabolismo da vitamina D (14, 15).

A PTH é inibida pela 1,25(OH)₂D e pelo cálcio, enquanto o FGF-23 é induzido pela 1,25(OH)₂D e pelo fósforo, protegendo os mamíferos contra a hipercalcémia e hiperfosfatémia respetivamente. Em ambas as situações podem ocorrer calcificações ectópicas (12, 46).

O rim expressa algumas proteínas que estão dependentes da 1,25(OH)₂D, como a bomba de cálcio da membrana plasmática, os canais epiteliais de cálcio (canais iónicos recetores de potencial transitório, TRPV5 e TRPV6), o permutador de sódio e cálcio e a calbidina, todos presentes nos túbulos renais e agem coordenadamente na regulação do transporte de cálcio nos nefrónios (49, 73).

Outra enzima metabólica importante é a 25-hidroxivitamina D-24-hidroxilase (24-hidroxilase) que é encontrada no rim, intestino, fibroblastos, linfócitos, medula, pelos macrófagos e possivelmente em outros tecidos (12). A 24-hidroxilase, também conhecida pela sigla CYP24A1, é uma enzima da família do citocromo P-450, é induzida tanto pelo FGF-23 como pela 1,25(OH)₂D, e catalisa 24-hidroxilação da 25(OH)D a 24.25(OH)₂D e da 1,25(OH)₂D a 1,24,25(OH)₃D,

ambas as reações iniciam o processo metabólico de inativação da vitamina D pela oxidação do carbono 24 (12, 15). Como o rim e intestino são locais ricos em 24-hidroxilase, são os locais de maior inativação da vitamina D (14). A ação da 24-hidroxilase gera metabolitos que são mais polares e menos ativos biologicamente e conseqüentemente metabolizados e excretados na bÍlis (19). A indução do seu próprio catabolismo, pela 1,25(OH)₂D constitui um *feedback loop* que previne a estimulação excessiva do VDR (34).

Em resumo, o rim, para além de ser o local de síntese da 1,25(OH)₂D responde à ação hormonal, aumentando a eficiência na reabsorção de cálcio e fósforo, desempenhando um papel vital na conservação do cálcio e fósforo, também direta ou indiretamente, a 1,25(OH)₂D, regula os sistemas de transporte de cálcio localizados na porção distal do nefrônio (49).

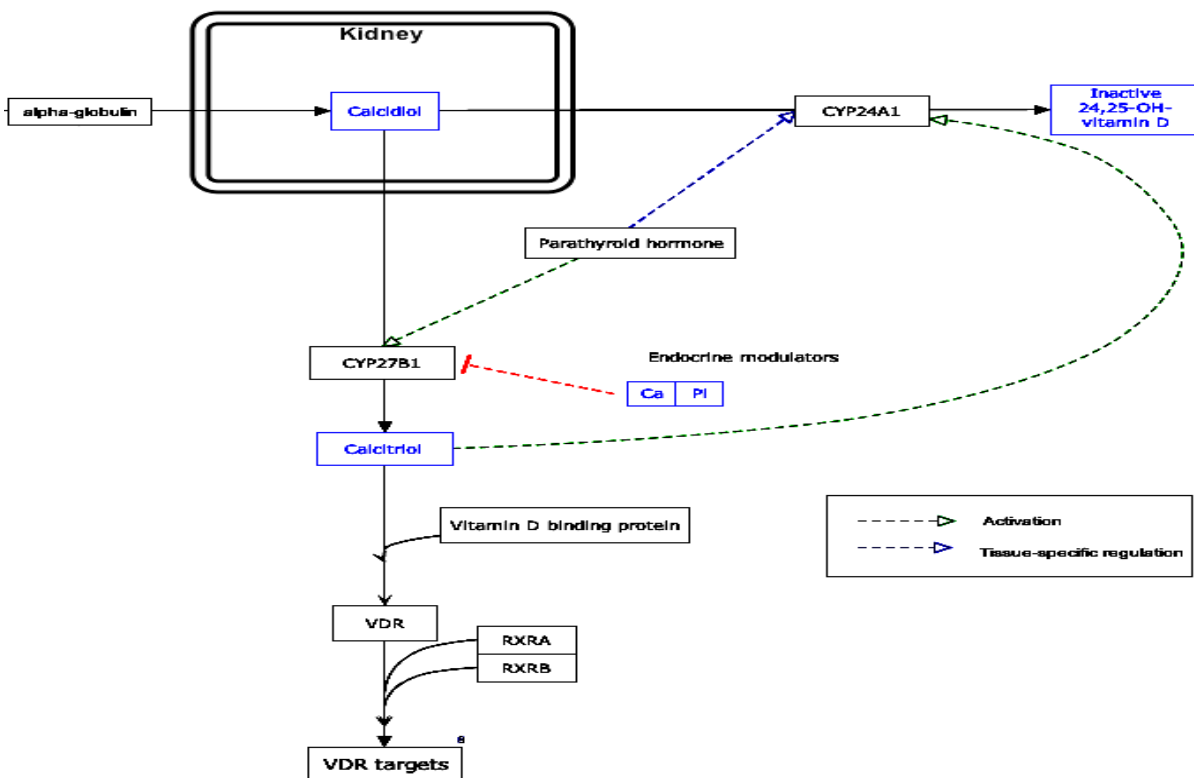


Figura 6: Regulação do metabolismo da vitamina D a nível renal Adaptado de Alexander Pico, et al, 2010 (74).

1.7 Doença renal e a sua influência sobre os níveis de vitamina D

Existe uma grande prevalência de doença renal em todo mundo e a doença renal crónica (DRC) é considerado um problema de saúde mundial significativo, devido ao aumento do risco cardiovascular e aumento da mortalidade e morbidade (75). Apesar da DRC em crianças e adolescentes ser rara, quando acontece tem efeitos devastadores no seu desenvolvimento, originando elevada morbidade e a sua incidência de fase terminal tem vindo a aumentar nas últimas duas décadas (76, 77).

O estadió final de doença renal é uma condição rara nas crianças, mas sabe-se que na Europa, por ano cerca de 9 crianças por milhão, abaixo dos 20 anos de idade começam terapia renal de substituição, assegurada por hemodiálise, diálise peritoneal ou transplante renal, sendo que este último amplamente considerado o melhor tratamento (78).

Em Portugal, em 2008 realizaram-se cerca de 50 transplantes por milhão de habitantes (pmh) em adultos e crianças, sendo a percentagem dos transplantes pediátricos, 3,8% (78, 79). Desde esta data foi implementado em Portugal continental o modelo de gestão integrada da DRC que levou a uma reestruturação do modo de prestação de cuidados a estes casos (79).

Entre 2009 e 2011, em Portugal a incidência pediátrica da terapia de substituição renal em doentes entre os 0 e os 14 anos, era de 8,6 pmh, sendo que maioritariamente os doentes começaram pela diálise peritoneal (80). No fim de 2011 os transplantes renais realizados foram 30,4 pmh dentro dessa faixa etária e em 2013 realizaram-se um total de 448 destes tratamentos (80, 81).

A elevada prevalência da doença renal deve-se em grande parte ao aumento da DM e da obesidade, assim como a alta prevalência de hipertensão (76, 82). Aparentemente muitos dos riscos para DRC, começam em criança e são precursores do dano renal à medida que se envelhece (83, 84). Dislipidémias, DM e hipertensão, fatores de risco de DCV coexistem com a DRC e são associados a piores prognósticos e a mortalidade; entre outros exemplos de fatores potenciadores, temos o processo inflamatório, o *stress* oxidativo, a resistência à

eritropoietina (EPO), a anemia, a deficiência em vitamina D, a proteinúria e a calcificação vascular (83, 85).

Apesar dos vários fatores que podem causar deterioração da função renal, o maior fator de risco é a própria insuficiência renal, caracterizada por um baixo grau de inflamação crónica que contribui para a progressão da DRC e para a alta comorbidade da DCV (84, 85).

Como a DRC é progressiva, quando há uma perda significativa da função renal, é importante estimar-se a taxa de filtração glomerular (TFG) (84), utilizando-se equações preditivas, como a equação de Schwartz, evitando colheitas de urina de 24 horas. Para obtermos a TFG é necessário um soluto que seja completamente filtrado pelos glomérulos e que não seja reabsorvido ou secretado ou metabolizado pelo rim, a sua concentração filtrada é igual à quantidade excretada pelo rim. Na prática clínica, a TFG é avaliada através da creatinina (76, 84, 86).

O cálculo da TFG recorrendo à determinação da creatinina justifica-se porque esta é produzida pelo corpo a uma taxa relativamente constante em condições normais e deste modo é uma avaliação fácil e económica (87). Contudo, apresenta algumas limitações: a creatinina para além de ser livremente filtrada pelos glomérulos sofre secreção tubular e, como resultado, vai tender a sobrevalorizar a TFG; a creatinina plasmática depende diretamente da massa muscular, que varia com o sexo, idade e etnia; outros fatores podem alterar os seus níveis sem alterar a TFG como alterações da dieta proteica, exercício e fármacos, como a cimetidina e fibratos (87).

A relação inversa da creatinina no plasma com a TFG também não é direta, o que significa que o nível de creatinina só aumenta após a TFG ter decaído cerca de 50%-60% do seu nível normal. Por estes motivos, o uso isolado de creatinina plasmática para estimar a TFG é insatisfatório. Daí que, clinicamente, a depuração da creatinina é o método mais utilizado para obter informação sobre a TFG (76, 88).

Tendo por base o valor da TFG classifica-se a DRC em 5 estádios, consoante a severidade da doença (ver tabela 1), adotando a sua classificação descrita pelo guia de prática clínica da *National Kidney foundation's Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (KDOQI guidelines)* (89). A progressão da patologia pode

atingir o estágio 5, sendo consensual que os indivíduos apresentem uma TGF <15 ml/min/1.73m², acompanhada na maioria dos casos por urémia elevada, ou pela necessidade de se iniciar uma terapia de substituição renal como diálise ou transplante renal.

Tabela 1 Classificação da DRC. Adaptado da *KDOQI guideline*, 2013 (89).

Estadio	Descrição	TGF
1	Lesão renal com TFG normal	≥90
2	Lesão renal com diminuição ligeira de TFG	60-90
3	Diminuição moderada de TFG	30-59
4	Severa diminuição de TGF	15-29
5	Falência renal	<15 (ou diálise)

Porém, as *KDOQI guidelines* não contemplam na sua classificação pacientes com menos de 2 anos, assim para estes indivíduos extrapola-se a percentagem de perda função renal em cada estadio da *KDOQI-guideline* tendo em conta os valores de TFG (83, 89, 90).

Dentro da DRC a insuficiência renal crónica (IRC) é definida como uma anormalidade estrutural ou funcional no rim com a duração de, pelo menos, três meses (84, 89). Afeta virtualmente todos os sistemas de órgãos do nosso corpo, tendo assim um grande impacto não só na mortalidade mas também na qualidade de vida dos indivíduos. Assim o rim tem um papel fulcral na eliminação de catabolitos assim como na manutenção da homeostasia de fluidos e electrólitos, para além de ser o local de ativação da vitamina D e produção da EPO (76).

A indicação para diálise pressupõe a existência de um desequilíbrio electrolítico que não pode ser tratado de outro modo, normalmente com hipocalcémia, com acumulação de líquidos que leva a hipertensão ou insuficiência cardíaca congestiva, ou urémia e isto pode coexistir com uma TFG normal (91).

A diálise peritoneal pode ser realizada diariamente, em situações mais débeis pode-se recorrer à hemodiálise, mas de facto a única forma real de terapia renal de substituição é o transplante renal (76).

Em crianças e adolescentes com DRC e com normal equilíbrio hidroelectrolítico, a TFG pode servir como o único sinal de insuficiência renal (84).

Considerando a faixa etária, a TFG poderá ser calculada com o recurso à equação de Schwartz como anteriormente referido (88, 92). A equação de Schwartz determina a filtração glomerular, expressando-se em mililitros por minuto, como resultado do produto de uma constante a multiplicar pela altura expressa em centímetros, a dividir pela concentração plasmática da creatinina expressa em miligramas por decilitro. O valor desse fator varia de acordo com a idade, sendo para crianças inferior a 2 anos igual a 0,45 se o peso for normal e de 0,33 para baixo peso; entre os 2 e os 16 anos é igual a 0,55; e depois da puberdade para o sexo masculino é de 0,7 e para o sexo feminino é de 0,55 (90).

Em crianças, a referida patologia pode decorrer de: doenças hereditárias (síndrome de Alport; doença renal policística), malformações congénitas (agenesia renal, displasia renal, ectopia renal), infeção (síndrome urémico hemolítico, glomerulonefrite pós-estreptocócica), síndrome nefrótico (proteinúria, hipoalbuminémia, edema, hiperlipidémia), doença sistémica (lúpus eritematoso sistémico e diabetes), traumas como cirurgias, queimaduras, desidratação ou hemorragias, que causem diminuição do fluxo sanguíneo e podendo levar assim a insuficiência renal aguda (IRA) ou refluxo ou obstrução urinária (82). Apesar destas inúmeras causas, a mais comum, em crianças é a uropatia obstrutiva resultante de malformação congénita (76, 80).

Crianças e adolescentes com DRC podem manifestar atraso no crescimento e anemia e está associada a um risco elevado da morbidade e mortalidade. Nestes casos à medida que as funções renais se deterioram devem receber tratamento para a anemia, para o défice de crescimento e regular a tensão arterial além de ser vital ter em atenção a sua dieta alimentar (84).

A progressão da doença nestes indivíduos é maior durante os períodos de crescimento acelerado, normalmente nos primeiros anos de vida e na adolescência, dado que o forte aumento da massa corporal resulta num aumento da procura de filtração nos nefrónios remanescentes. Na adolescência, as alterações hormonais contribuem também para a rápida deterioração da filtração glomerular. (90, 93).

A IRC é então associada a uma série de distúrbios do metabolismo mineral e ósseo caracterizada por hiperfosfatemia, hipocalcemia, hipertiroidismo secundário e com acentuada diminuição da síntese da forma ativa de vitamina D, 1,25(OH)₂D (94, 95).

Deste modo o déficit de vitamina D está intimamente ligado com a IRC. *Levin, Adeera, et al*, demonstraram que indivíduos com DRC apresentam uma maior incidência isolada de deficiência em 1,25(OH)₂D do que uma deficiência isolada de 25(OH)D₃, pondo em causa a importância do doseamento da 25(OH)D nestes doentes (96).

O nível de vitamina D ativada, 1,25(OH)₂D é indicador de *status* da vitamina D para indivíduos com DRC. Além disso os níveis de 25(OH)D parecem ser úteis na monitorização desta patologia pois os níveis decrescem à medida que a deterioração da função renal aumenta (94, 96).

S. Pilz et tal (97) demonstraram que níveis baixos de 25(OH)D estão fortemente associados à mortalidade e à DCV em pacientes com IRC no estágio 3-5, *Anand S. et al* (37) publicaram em 2013, um estudo onde demonstraram um considerável aumento de mortalidade e de hospitalizações em pacientes em diálise com deficiência severa de vitamina D (<20ng/mL) (37).

Sendo o rim é um dos principais responsáveis pela síntese de 1,25(OH)₂D, é de esperar que a sua produção diminua à medida que a função renal se deteriore. Um possível mecanismo, para a referida diminuição é a perda progressiva de nefrónios, mais precisamente dos túbulos proximais, embora este seja um mecanismo que intervém mais tardiamente na evolução das nefropatias (98).

Insuficiência da função renal, nos estádios iniciais, resulta na retenção de fósforo. A hiperfosfatemia resultante é um inibidor potente da 25 (OH) D-1α hidroxilase e o decréscimo desta enzima consequentemente leva à diminuição da 1,25(OH)₂D, circulante. Além disso, baixos níveis de 25(OH)D podem ocorrer na proteinúria nefrótica devido à perda direta do ligando da PTVD 25(OH)D na urina (13, 33).

Dada a importância da proteinúria em crianças com DRC, visto que a sua existência, geralmente complica a DRC (84), a avaliação das concentrações livres e PTVD é um primeiro passo importante para a compreensão de consequências no metabolismo anormal de vitamina D (99).

Com a progressão da doença o declínio da TFG está associado com o declínio dos níveis de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, pois a $25(\text{OH})\text{D}$ disponível para a CYP27B1 diminui limitando a capacidade do rim de produzir $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, sendo estes níveis quase indetetáveis no estágio final da IRC (13, 94).

Resumindo, verifica-se então que a deficiência de vitamina D é multifatorial, devida a alterações de hábitos alimentares e estilos de vida que limitam a exposição solar.(4, 91), e no caso de indivíduos com DRC, esta é ainda predisposta por vários motivos, que agravam esse defice.

1.8 Objetivo

Com este estudo pretende-se correlacionar as duas formas de vitamina D, a vitamina $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ e a vitamina $25(\text{OH})\text{D}$ com os resultados de marcadores laboratoriais da função renal e PTH, numa população pediátrica com doença renal, que recorreram a consultas de nefrologia, propriamente ditas, bem como, às suas diversas vertentes, como é o caso da consulta de nefrologia-IRC, consulta diálise peritoneal e consulta hospital dia nefrologia

Assim espera-se avaliar no Hospital Pediátrico do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, E..P.E. (CHUC-HP), o défice de vitamina D e verificar a sua relação com o grau de insuficiência renal.

2 Material e métodos

Entre outubro de 2014 e setembro de 2015, foram recolhidas 89 de amostras da população pediátrica que recorreram à consulta de nefrologia do CHUC-HP. Para efeitos de período de colheita, de outubro a abril considerou-se época de inverno e de maio a setembro considerou-se época de verão.

Com exceção dos doseamentos de vitamina D, todos os outros parâmetros analisados foram determinados no dia da consulta logo após realização da colheita, por fazer parte do protocolo normal dos cuidados de saúde de nefrologia. Aquando da realização de análises laboratoriais, uma amostra de plasma de heparina-lítio ou plasma de EDTA foi separada, guardada e congelada a -20°C , para posterior doseamento da vitamina $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ e da vitamina $25(\text{OH})\text{D}$.

A realização de todas as análises foi posterior à calibração e realização de controlos de dois níveis (patológico e normal) para os diferentes parâmetros analisados.

2.1 Marcadores laboratoriais

2.1.1 Doseamento da vitamina $25(\text{OH})\text{D}$

O doseamento da vitamina $25(\text{OH})\text{D}$ foi realizado no autoanalisador LIAISON[®], *Dia-Sorin Inc., Stillwater, Minnesota, USA*.

Os níveis de vitamina $25(\text{OH})\text{D}$ plasmático determinado com recurso a um imunoensaio quimioluminiscente competitivo (CLIA) direto. Durante a primeira incubação, a vitamina $25(\text{OH})\text{D}$ é dissociada da sua proteína de ligação e liga-se ao anticorpo específico na fase sólida. Ao fim de 10 minutos, é adicionado o marcador vitamina D ligado a um derivado de isoluminol. Após uma segunda incubação de 10 minutos, o material não ligado é removido com um ciclo de lavagem. Subsequentemente, os reagentes iniciadores são adicionados e inicia-se uma reação quimioluminiscente rápida. O sinal de luz é medido por um fotomultiplicador como unidades de luz relativas, sendo inversamente

proporcional à concentração da vitamina 25(OH)D presente nos calibradores, nos controlos ou nas amostras. A concentração da vitamina 25(OH)D é apresentada em ng/mL, para converter o resultado para unidades SI (nmol/L), multiplica-se o valor obtido pelo fator de conversão de 2,5. O limite de deteção para a vitamina 25(OH)D é de 4,0 ng/mL.

Valores de vitamina 25(OH)D entre 30 a 100 ng/mL são considerados normais.

2.1.2 Doseamento da vitamina 1,25(OH)₂D

O doseamento da vitamina 1,25(OH)₂D foi realizado no autoanalisador LIAISON[®], *Dia-Sorin Inc., Stillwater, Minnesota, USA*.

Os níveis de vitamina 1,25(OH)₂D plasmático determinado com recurso a um ensaio do tipo sanduíche modificado em três passos que utiliza uma proteína de fusão recombinante para captura da vitamina 1,25(OH)₂D e um anticorpo monoclonal de murino que reconhece especificamente o complexo formado. Durante a primeira incubação, as amostras são incubadas com a proteína recombinante (agente de ligação) e o tampão de ensaio. Após esta incubação, a fase sólida que contém o anticorpo monoclonal específico é adicionada, permitindo a sua ligação ao complexo resultante da primeira incubação. Após a segunda incubação realiza-se o ciclo de lavagem para remover o material não ligado. A terceira etapa consiste na adição de conjugado e subsequente incubação. O material não ligado é removido com um segundo ciclo de lavagem. Os reagentes iniciadores são então adicionados e inicia-se uma reação quimiluminescente rápida. O sinal de luz é medido por um fotomultiplicador como unidades relativas de luz, sendo proporcional à concentração de vitamina 1,25(OH)₂D presente na amostra.

O resultado da vitamina 1,25(OH)₂D é expresso em pg/mL, para converter os resultados para unidades SI (pmol/L), o valor obtido é multiplicando por 2,4, e o limite de deteção deste ensaio é de 5,0 pg/mL.

O intervalo de referência para vitamina 1,25 (OH)₂D é de 25 a 86,5 pg/mL, para todas as idades.

2.1.3 Doseamento da PTH

A PTH foi doseada no autoanalisador ADVIA *Centaur*® XP *Immunoassay System*.

A PTH intacta é determinada recorrendo a um imunoensaio do tipo sanduíche, recorre à tecnologia quimioluminométrica direta e utiliza quantidades constantes de dois anticorpos anti-PTH humana. O primeiro anticorpo é um anticorpo policlonal anti-PTH humano de cabra (N-terminal 1-34) marcado com éster de acridina, o segundo anticorpo é um anticorpo policlonal anti-PTH humano de cabra biotilado (região 39-84). A estreptavidina na fase sólida é ligada por covalência a partículas paramagnéticas de látex. Existe uma relação direta entre a quantidade de PTH presente na amostra do doente e a quantidade de unidades relativas de luz detetadas pelo sistema. O fator de conversão para converter de unidades convencionais (pg/ml) para as do Sistema Internacional (SI) (pmol/l) é de 0,106. E os valores normais da PTH, para todos os indivíduos, variam entre 9-72 pg/mL.

2.1.4 Outros Doseamentos

Os restantes doseamentos foram realizados pelos métodos laboratoriais *standards* de tecnologia MicroSlide™, utilizando o autoanalisador VITROS® 5.1 FS *Chemistry Systems (Ortho-Clinical Diagnostics, Buckinghamshire, United Kingdom)* e os seus métodos são descritos seguidamente.

2.1.4.1 Doseamento de Creatinina

O doseamento de creatinina foi feito com recurso à tecnologia MicroSlide™, o slide creatinina é constituído por um elemento analítico de múltiplas camadas revestido por um suporte de poliéster, ao qual é adicionada uma gota da amostra, sendo depois distribuída uniformemente pela camada de difusão para as camadas subjacentes. A creatinina difunde-se para a camada de reagente, onde é hidrolisada. A creatinina é convertida em sarcosina e ureia pela creatina

amidinohidrolase. A sarcosina, na presença da oxidase de sarcosina, é oxidada dando origem a glicina, formaldeído e peróxido de hidrogénio. Finalmente, o corante leuco é oxidado pelo peróxido de hidrogénio, sob efeito catalítico da peroxidase, para formar um produto corado. Assim, após a adição da amostra ao slide, procede-se à incubação do mesmo, durante a fase de reação inicial, a creatina endógena na amostra é oxidada. A alteração final na densidade do reflexo é medida em 2 pontos temporais. A diferença de densidade do reflexo é proporcional à concentração de creatinina presente na amostra.

Valores de creatinina plasmáticos são analisados em, em função da idade: valores são considerados normais entre 18-88 $\mu\text{mol/L}$ para crianças até 1 ano de idade; 27- 62 $\mu\text{mol/L}$ para crianças entre 1 a 12 anos de idade; e 46-110 $\mu\text{mol/L}$ para crianças com idade superior a 12 anos.

2.1.4.2 Doseamento de Proteínas urinária

O doseamento de proteína urinária foi feito com recurso à tecnologia MicroSlide™, o slide proteínas urinárias é constituído por um elemento analítico de múltiplas camadas revestido por um suporte de poliéster.

Sendo adicionados 50 μl da amostra de urina do doente no slide, sendo esta uniformemente distribuída pela camada de difusão para as camadas subjacentes. A ligação das proteínas a um complexo de violeta de pirocatecol-molibdato na presença de oxalato provoca um desvio do pico máximo de absorção de 450 para 670 nm. Depois de um período de incubação determinado, a densidade ótica do corante é medida por espectrofotometria. A quantidade do complexo corado é proporcional à concentração de proteínas na amostra.

Valores de proteínas urinárias entre 1 a 10,5 mg/dL são considerados normais independentemente da idade.

2.1.5 Determinação da TFG

Considerando a faixa etária, a TFG poderá ser calculada com o recurso à equação de Schwartz (88, 92). Esta equação permite determinar a filtração glomerular, expressando-se em mililitros por minuto, como resultado do produto de uma constante a multiplicar pela altura expressa em centímetros, a dividir pela concentração plasmática da creatinina expressa em miligramas por decilitro. O valor desse fator varia de acordo com a idade, sendo para crianças inferior a 2 anos igual a 0,45 se o peso for normal e de 0,33 para baixo peso; entre os 2 e os 16 anos é igual a 0,55; e depois da puberdade para o sexo masculino é de 0,7 e para o sexo feminino é de 0,55 (90).

A TFG é considerada normal se for ≥ 90 ml/min/1.73m².

2.2 Análise Estatística

Todos os dados resultantes da amostragem avaliada, foram analisados de forma descritiva, sendo reportados as medidas de tendência central (média, mediana e moda), medidas de dispersão (desvio padrão, variância) bem como distribuição de frequências e percentagens, quando adequado.

O teste de Kruskal-Wallis (ANOVA) foi utilizado para comparar diferenças de concentração da vitamina 1,25(OH)₂D, entre os grupos dos diferentes estádios da DRC.

O coeficiente de correlação de Pearson foi usado para determinar a relação entre as duas formas de vitamina D com a creatinina. Mas no caso da PTH e da TFG utilizou-se o Spearman's rho (estatística não paramétrica), dado que não se obteve uma distribuição normal.

O teste T de Student para dados emparelhados, foi utilizado para comparar médias da vitamina 25(OH)D nas duas épocas distintas do ano.

Todos os dados foram analisados usando o programa informático IBM-SPSS (IBM Corp. Released 2013 IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp). O significado estatístico é assumido para um valor de $p \leq 0.05$.

3 Resultados

3.1 Caracterização da população em estudo

Foram recolhidas 89 amostras de plasma de indivíduos, 46% (n=41) eram do sexo masculino e 54% (n=48) eram do sexo feminino. As suas idades variaram entre 1 mês e os 17 anos, sendo que a média de idades foi de $11,18 \pm 5,04$, a sua mediana de 12 e a moda de 17 (tabela 2).

Tabela 2 Características gerais dos indivíduos que fazem parte do estudo

SEXO F (%)	53,9	48
Sexo M (%)	46,1	41
IDADE anos (\pm SD)	$11,2 \pm 5,04$	
n		89

3.2 Caracterização dos indivíduo quanto à DR

Todos os indivíduos constantes da nossa amostra sofriam de algum tipo de doença renal, sendo que tinham como diagnóstico de insuficiência renal 49,4% (n=44), destes 39 indivíduos sofriam de IRC e 6 encontravam-se a realizar diálise peritoneal; e os restantes indivíduos sofriam de IRA. Foram diagnosticados com síndrome nefrótica 14,6% (n=13) dos indivíduos e os restantes 35,9% (n=32) o diagnóstico foi outras DR.

A etiologia da DR apresentava uma grande heterogeneidade sendo a sua principal causa as anomalias congénitas (40,4%) (tabela 3).

No que respeita à toma de suplemento de vitamina D ativado cerca de 35% dos indivíduos tinham a prescrição médica para o realizar (tabela 3).

Tabela 3 Distribuição da população por etiologia da DR, suplementação com vitamina 1,25 (OH)D e tratamento com diálise.

N=89 (%)	
ETIOLOGIA DA DR (%)	
S. NEFRÓTICO	13,0 (14,6)
ANOMALIAS CONGENITAS (HIPOPLASIA;DISPLASIA C/ OU S/ RVU; OBSTRUÇÃO)	36,0 (40,4)
DOENÇAS SISTÉMICAS INFLAMATORIAS	2,0 (2,2)
SHU	3,0 (3,4)
DESCONHECIDO	2,0(2,2)
OUTROS	33,0(37,1)
DOENTES em DIALISE (%)	6,0 (6,7)
SUPLEMENTO	
1,25 (OH)D	31,0 (34,8)

Os indivíduos foram distribuídos por estadios da IRC de acordo com o valor da TFG, segundo as *guidelines* da *KDOQI*. A TFG foi calculada utilizando a equação de Schwartz e a sua média foi de 96,6±48,7. Mais de metade dos indivíduos, 51 (57,3%) foram englobados no estadio 1, 15 indivíduos no estadio 2 (16,9%), nos estádios 3 e 4 foram incluídos 10 indivíduos em cada um e apenas 2 (2,3%) indivíduos foram incluídos no estadio 5. (tabela 4).

Tabela 4 Distribuição da população por estadio da IRC de acordo com o valor da TFG, segundo as *guidelines* da *KDOQI*. Na TFG, o valor em falta corresponde a indivíduo em cadeiras de rodas, o qual não se obteve os dados antropométricos, para efetuar o cálculo da TFG.

	x±σ	N=89 (%)
TFG (ml/min/1.73m ²)	96,6±48,70	
ESTADIO IRC (%)		
1		51,0 (57,3)
2		15,0 (16,9)
3		10,0 (11,2)
4		10,0 (11,2)
5		2,0 (2,2)

3.3 Doseamento de 25(OH)D, em dois momentos diferentes do ano

Foram realizados 139 doseamentos de vitamina 25(OH)D, resultantes de duas amostragem em períodos diferentes. A primeira num total 68 amostras recolhidas no período de inverno, e uma segunda amostragem de 71 amostras, no período de verão. Este procedimento permitiu que se determinassem em 50 indivíduos os níveis de vitamina 25(OH)D, em dois momentos distintos. Considerando os dois momentos deste estudo, a média dos valores obtidos para o doseamento da vitamina 25(OH)D no período de inverno foi de $19,5 \pm 7,88$ ng/mL e no segundo período foi igual a $26,5 \pm 9,03$ ng/mL (tabela 5).

Tabela 5: Tabela de análise descritiva dos doseamentos laboratoriais

	N		Média	Mediana	Moda	Desvio Padrão
	Valido	Missing				
Vit 25(OH)D inverno (ng/mL)	68	21	19,5	18,0	15,9	7,88
Vit 1,25(OH) ₂ D (pg/mL)	84	5	44,8	43,6	56,7	20,21
Vit 25(OH)D verão (ng/mL)	71	18	26,5	25,8	24,3	9,03
Proteínas urinárias (mg/dL)	87	2	265,9	15,7	,00	1391,24
TFG (ml/min/1.73m ²)	88	1	96,6	102,9	12,3 ^a	48,66
PTHi (pg/mL)	58	31	73,6	49,3	94,6	63,34
Creatinina (μmol/L)	89	0	115,6	67,0	49,0	108,40

No período de inverno 61,76% dos indivíduos apresentaram valores abaixo dos 20 ng/mL e destes 10,9% (n=7) apresentavam deficiência severa pois apresentavam valores de vitamina 25(OH)D inferiores a 10 ng/mL. Apenas 14,7% (n=10) dos indivíduos apresentavam valores considerados normais para a idade de vitamina 25(OH)D (tabela 6). No verão esta ultima percentagem aumentou passando a ser de 32,4% (n=23), é de notar que não houve nenhum individuo com deficiência severa e apenas 25,4% apresentavam deficiência de vitamina 25(OH)D (tabela 6).

Tabela 6 Tabela de análise descritiva dos doseamentos de 25(OH)D, em dois momentos diferentes do ano

Valores 25 (OH)D	Inverno		Verão	
	N	%	N	%
0-10 (DEFICIENCIA SEVERE)	7	10,29	0	0,00
10-20 (DEFICIENCIA)	35	51,47	18	25,35
20-30 (INSUFICIENCIA)	16	23,53	30	42,25
≥30 (Valor Adequado)	10	14,71	23	32,39

Para os 50 indivíduos avaliados no doseamentos de vitamina 25(OH)D, nos dois momentos em estudo, verificou-se que existe uma correlação moderada positiva ($r=0,585$) com significado estatístico ($p < 0,0001$) para um teste t para amostras emparelhadas (Figura 8-B), este dado indica-nos que no período de inverno a média dos valores de vitamina 25(OH)D foi em termos estatísticos significativamente mais baixo que a média obtida no período de verão (Figura 8-A).

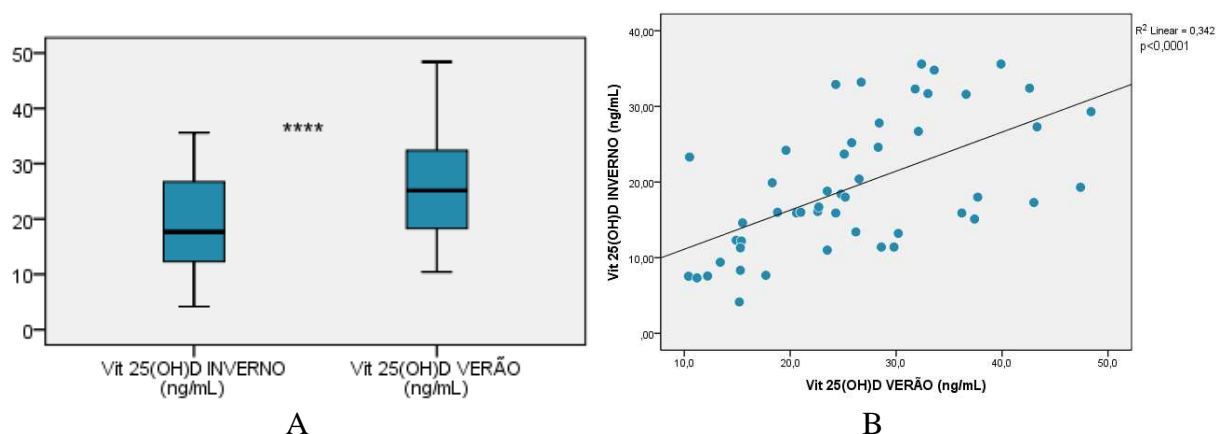


Figura 7:Relação do valor da vitamina 25(OH)D entre os períodos de inverno e de verão (A- Box-plot para 2 momentos de amostragem e B- Scatter do período de verão versus período de inverno).

3.4 Doseamento de 1,25(OH)₂D

No que diz respeito à determinação de vitamina 1,25(OH)₂D a média dos valores dos 84 doseamentos realizados foi de 44,8±20,21 pg/mL (tabela 5), destes, 14 apresentam valores inferiores a 25 pg/mL. Do total dos indivíduos, 31 (34,8 %) tomavam suplemento de vitamina 1,25(OH)₂D (tabela 3) tendo-se obtido uma média de valores na sua determinação de 36,9±23,09, enquanto que os indivíduos que não tomavam suplemento, a média de valores obtidos foi de 49,13±17,15. Comparando as médias obtidas nestes dois grupos, verificou-se a existência de diferenças estatisticamente significativas (p=0,007) entre ambas (figura 9).

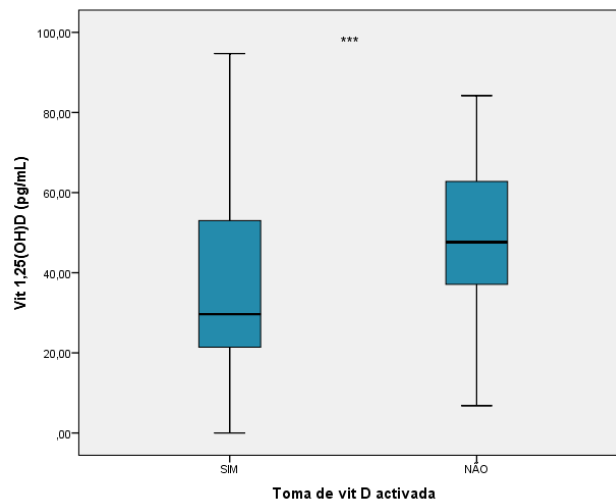


Figura 8 Comparação de médias e desvios padrão entre os grupos de indivíduos que tomam ou não suplementação de vitamina 1,25(OH)₂D.

3.5 Vitamina 25(OH)D e 1,25(OH)₂D e a sua relação com a IRC

Quando determinamos os valores médios das duas formas de vitamina D nos diferentes grupos de estádios de IRC, observa-se para a vitamina 25(OH)D que não há diferenças estatísticas nas médias dos valores nos diversos estádios, sendo que todos os valores obtidos são tendencialmente abaixo dos valores normais para as referidas idades da população em estudo. Pelo contrario, no que respeita à 1,25(OH)₂D, quando se compara os valores médios obtidos nos diferentes estádios de DRC, verificou-se diferenças estatisticamente significativas ($p=0,014$), em maior evidencia no primeiro estádio da doença.

A vitamina 25(OH)D não aparenta apresentar qualquer tipo de correlação com a 1,25(OH)₂D nos diferentes estádios da IRC, bem como com a suplementação ou não com vitamina D ativada.

3.6 Correlação dos marcadores da função renal com a PTH e vitamina D

Os valores de creatinina plasmáticos obtidos tiveram uma média de $115,6 \pm 108,41$ $\mu\text{mol/L}$, situando-se acima dos valores normais, assim como acontece com a média das proteínas urinárias, cujo valor médio foi de $265,9$ mg/dL (Tabela 4).

Com os valores de creatinina e com os dados antropométricos, procedeu-se ao cálculo da TFG, utilizado a equação de Schwartz. A TFG apresenta uma média de valores de $96,5 \pm 48,7$ ml/min/1.73m^2 .

A creatinina tem uma relação forte e de sinal negativo com a TFG ($r=-0,817$), ou seja para valores aumentados de creatinina correspondem valores mais baixos de TFG.

O doseamento da PTH foi realizado em 61 amostras. Aquando da verificação dos pré-requisitos da estatística paramétrica, pela análise do *boxplot* observou-se a existência de *outliers*, três dos indivíduos tinham valores de PTH superiores a 300 pg/mL tendo por isso sido excluídos de avaliação geral (Figura 10).

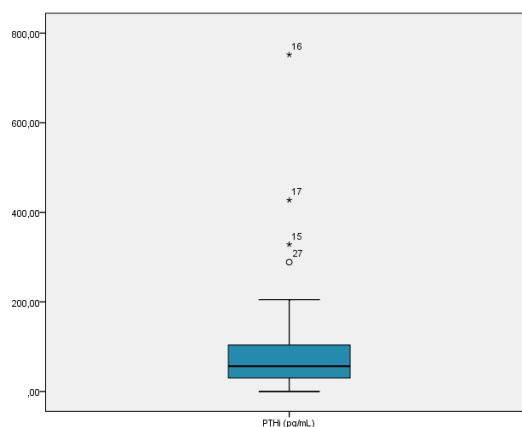


Figura 9: *Box-plot* da PTH onde se pode observar a existência de *outliers*. Apenas foram desprezados os valores superiores a 300pg/mL.

Dos 58 doseamentos feitos de vitamina D com determinação de PTH, o valor médio desta é de $73,6 \pm 63,34$ pg/mL

Quando relacionamos a PTH com valores de creatinina registou-se uma correlação moderada positiva ($r=0,446$) com grande significado estatístico para um $p < 0.001$. Ao analisamos os diversos resultados obtidos de PTH de acordo com a distribuição da população por estágio da IRC, verificamos que existe diferenças nesta ao longo das diferentes fases da IRC ($p=0,001$).

Quando verificamos a possível associação dos valores de PTH com as duas formas de vitamina D, verificamos que este apenas se correlaciona com a vitamina 25(OH)D nos dois períodos da sua avaliação. Existe uma correlação inversa, embora seja fraca ($r=-0,359$ para $p < 0.01$) para o período de verão (Figura 11-B). E o mesmo acontece no período de inverno em que a correlação sendo, também indireta, é neste caso moderada ($r=-0,424$ para $p < 0.004$) (Figura 11 A). Por sua vez quando correlacionamos com a TFG verifica-se uma correlação moderada de sinal negativo ($r=-0,512$) com elevado significado estatístico ($p < 0,001$), isto significa que para valores mais elevados de PTH, menores são os valores de TFG.

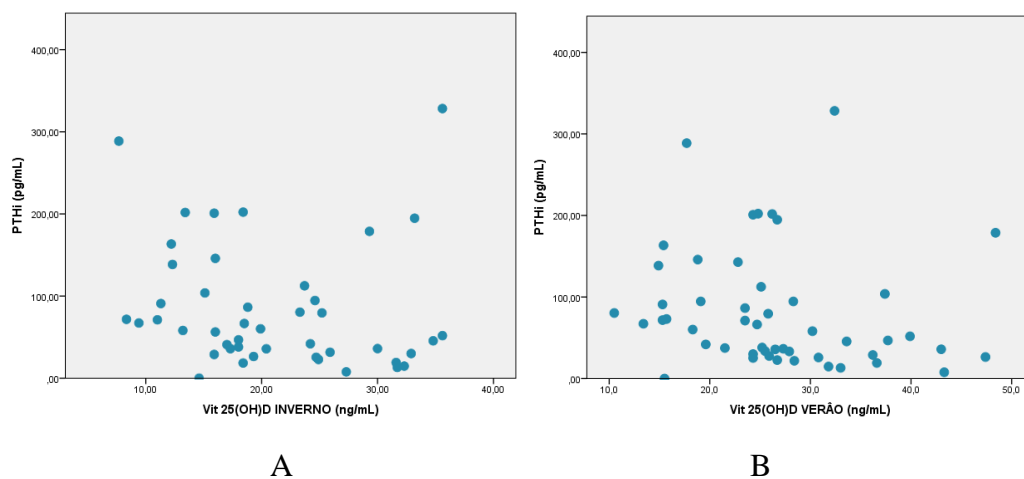


Figura 10: *Scatter* da relação entre PTH e vitamina 25(OH)D: onde se verificou uma correlação inversa, entre ambas. Para o período de verão verificou-se uma correlação fraca ($r=-0,359$ para $p< 0.01$) entre PTH e a vitamina 25(OH)D. e no inverno a correlação sendo, também indireta, foi moderada ($r=-0,424$ para $p< 0.004$). (A- *scatter* referente ao período de inverno e B-*scatter* referente ao período de verão).

4 Discussão

No presente estudo de todos os indivíduos avaliados com DR, 49,4% tinham como diagnóstico insuficiência renal, foi observado um discreto predomínio da DR no sexo feminino, o que contraria o descrito na literatura que afirma que esta, em idades pediátricas, incide em maior frequência no sexo masculino (77, 81). Registrou-se a incidência da doença em todas as faixas etárias, tendo-se observado um predomínio nas crianças em idade escolar, dados semelhantes aos descritos nos registos da Sociedade Europeia de Diálise e Transplantação ESPN/ERA-EDTA (81).

As principais causas da DRC na população envolvida no nosso estudo foram anomalias urológicas congénitas, (40,4%), as mesmas que foram descritas em diferentes trabalhos relacionados com a etiologia da DRC em crianças (76, 77, 82, 84). Os indivíduos que sofrem de IRC e que necessitam de terapêutica de substituição renal, eram no presente estudo, todos tratados com diálise peritoneal, uma vez que ela apesar de ser menos eficiente que a hemodiálise, é tecnicamente mais fácil de se realizar, podendo ser utilizada em pacientes mais novos; evita alterações súbitas de fluidos e eletrólitos; pode ser realizada no domicílio e minimiza as restrições dietéticas (100-102). Contudo a escolha do método terapêutico de substituição renal depende de vários fatores, dentro deles o nível educacional e socioeconómico dos indivíduos em causa (100, 102).

No que refere aos valores de vitamina 25(OH)D obtidos para a população estudada entre outubro e abril, ou seja, no período de inverno, a média de valores foi de $19,5 \pm 7,88$ ng/mL, valor este considerado deficiente; e no período de verão, que engloba os meses de maio a setembro, obteve-se uma média de valores de $26,5 \pm 9,03$ ng/mL, valor considerado insuficiente. Atualmente é consensual que apenas os valores > 30 ng/mL são considerados como sendo níveis saudáveis e que todas as crianças e adultos devem manter os níveis ao longo de todo o ano (103).

No período de inverno, dos 68 indivíduos ao qual se realizou o doseamento da vitamina 25(OH)D apenas 10 (14,7%) apresentavam valores adequados dessa vitamina. Esta percentagem passa para mais do dobro, 32,4% quando realizamos os mesmos doseamentos mas no período de verão. A deficiência de vitamina D tem tido uma preocupante incidência nos indivíduos com DR sendo também um

facto comum presente na população mundial (104-107). Daí que a *Kidney Disease Outcomes Quality Initiative* (K/DOQI) tenha recomendado, em indivíduos com IRC, a verificação anual da existência de deficiência vitamina D (108, 109).

Em 2011, Holick, M.F., et al.(92) publicaram também uma diretriz para avaliação, tratamento e prevenção da deficiência de vitamina D, revisada e apoiada pela Sociedade de Endocrinologia dos Estados Unidos. A diretriz considera como deficiência de vitamina D concentrações plasmáticas de 25(OH)D menores de 50 nmol/L (20 ng/mL), insuficiência de vitamina D concentrações plasmáticas de 25(OH)D entre 50 e 74,9 nmol/L (20 -29,9 ng/mL), e suficiente entre 75 e 250 nmol/L (30-100 ng/mL) (92). Apesar de não reunir consenso global, estes são valores aceites internacionalmente (92, 105, 110).

Apesar das médias de concentrações da vitamina 25(OH)D obtidas terem sido abaixo dos valores considerados saudáveis, estas não aparentam estar relacionadas com a progressão da DRC, estando apenas correlacionadas com a época do ano, pois nos meses de inverno obtivemos valores mais baixos. Esta diferença sazonal explica variações de concentração em vitamina 25(OH)D, descrita e confirmado por diversos estudos (40, 105, 111). Verificou-se, também, que a associação da época do ano com a deficiência em vitamina 25(OH)D não varia consoante o estágio da DRC tal como já foi descrito anteriormente no trabalho de Kalkwarf, H.J. et al (106).

Em relação à vitamina 1,25(OH)₂D a média de valores obtidos foi de 44,8 pg/mL valor considerado normal, no entanto em treze dos indivíduos, que corresponde a cerca de 17% da amostra, obtivemos valores abaixo de 25 pg/mL para os quais há que realçar que se tem a informação de que destes, nove tomavam suplemento de vitamina 1,25(OH)₂D. O facto de encontrarmos valores vitamina 1,25(OH)₂D baixos em pessoas que supostamente tomam suplementação poderá explicar-se pelo não controlo da toma do mesmo ou pela dosagem não ser a adequada.

As diferenças nos valores de 1,25(OH)₂D observadas entre os grupos das diferentes fases de DRC e os que tomam ou não suplemento de vitamina D ativada, são estatisticamente significativas, sendo estes últimos que apresentam média de valores mais elevados e por sua vez são os que pertencem a estádios da

DRC menos severos., isto porque quem mais toma suplemento são os indivíduos que se encontram numa fase de IRC mais avançada

Os indivíduos que se encontram numa fase mais inicial da DRC apresentaram valores de 1,25(OH)₂D mais elevados, apesar de em todos grupos os valores médios obtidos serem considerados normais e em todos se registar uma diminuição da vitamina 25(OH)D. A vitamina 1,25(OH)₂D não aparenta apresentar qualquer tipo de correlação com a 25(OH)D, isto verificou-se tanto quando se tem em atenção os diferentes estádios da IRC, como quando há suplementação ou não com vitamina D ativada. A ausência de correlação entre as duas formas de vitamina D deve-se, provavelmente ao facto de 35% dos indivíduos estudados já estarem suplementados com vitamina 1,25(OH)₂D.

Esta ausência de correlação vai contra o que está descrito na literatura, pois nesta constata-se que a vitamina 1,25(OH)₂D se correlaciona positivamente com os valores de vitamina 25(OH)D sendo que à medida que a DRC progride há uma diminuição de ambas as formas de vitamina D (33, 109). Também, Matias PJ, et al no seu trabalho sobre efeitos da suplementação com colecalciferol em pacientes em hemodiálise observou valores basais de vitamina 25(OH)D e de 1,25(OH)₂D muito baixos com correlação positiva (112) sugerindo que há uma maior dependência de substrato nos estádios mais avançados de DRC e que a adequação de vitamina 25(OH)D é importante na DRC para a produção renal de 1,25(OH)₂D em estádios avançados de DRC quando a atividade da 1 α -hidroxilase está mais comprometida (106, 110).

Os valores médios de creatinina plasmática e das proteínas urinárias, como seria de esperar dada a patologia da população em estudo, encontram-se acima dos valores normais e dos 66,3% dos participantes que apresentavam proteinúria, 14,6% apresentavam mesmo síndrome nefrótico, isto complica, frequentemente, a DRC dos indivíduos em idade pediátrica (84).

Partindo dos resultados da creatinina calculou-se a TFG que apresentou uma média de valores de 96,5 \pm 48,7 ml/min/1.73m², valor normal mas de salientar o elevado desvio padrão que apresenta. A creatinina tem uma relação forte e de sinal negativo com a TFG (r=-0,817), ou seja para valores aumentados de creatinina correspondem valores mais baixos de TFG. Como a redução da TGF,

faz com que a 1- α -hidroxilação da vitamina 25(OH)D para 1,25(OH)₂D seja prejudicada, levando a um aumento compensatório da PTH para reverter a diminuição de vitamina 1,25(OH)₂D (13, 111).

Apesar de não havendo evidência de interação entre a DRC e a vitamina 25(OH)D, constatou-se que o declínio de vitamina 25(OH)D está associado a um aumento da PTH em todos os estádios da DRC. No presente estudo verificou-se a existência de uma correlação inversa, entre PTH e a vitamina 25(OH)D, tal como o descrito na literatura (95, 99, 106, 113)., embora seja uma correlação fraca, provavelmente por a presente amostra ser constituída por poucos elementos, apenas 58 indivíduos. Isto sugere que quem tem valores de vitamina 25(OH)D >20 ng/mL, não apresenta alterações significativas nos seus níveis de PTH (103). A mesma correlação foi reportada por diferentes estudos. Estudos estes que reportaram níveis plasmáticos de vitamina 25(OH)D em função dos níveis plasmáticos de PTH num gráfico *dot plot*, observaram que para os valores plasmáticos de PTH considerados normais irão corresponder a valores na casa dos 30-40 ng/mL de vitamina 25(OH)D, confirmando a existência de uma correlação negativa entre a PTH e a vitamina 25(OH)D (103, 114-116). À medida que um indivíduo se torna deficiente em vitamina D, há uma diminuição da absorção de cálcio a nível do intestino que condiciona os níveis de cálcio ionizado em circulação. Este sinal é reconhecido pela glândula paratireoide que em resposta aumenta a produção e secreção de PTH (34). A PTH por sua vez regula o metabolismo do cálcio pelo aumento da reabsorção de cálcio a nível túbulos renais, aumentando a mobilização do cálcio do esqueleto e aumentando a produção renal de 1,25(OH)₂D (34, 72).

Num estudo realizado em Espanha, 300 indivíduos, a taxa de diminuição da TFG foi correlacionada com os níveis de PTH, proteinúria e fosfatémia, dado que todos estes fatores podem ser modificados com tratamento adequado, devem ser tidos em conta aquando a decisão terapêutica, de modo a permitir a diminuir a progressão da DRC, atrasando o início da terapia de substituição renal e reduzir assim os custos (95, 117). É importante e relevante começar a avaliar a concentração da PTVD como primeiro passo para compreender os determinantes e consequências do metabolismo anormal da vitamina D nesta população (99).

Seguidamente a suplementação com vitamina D é fundamental, não só com vitamina 1,25(OH)₂D, como já atualmente se pratica em caso de DRC, mas também com vitamina 25(OH)D, não esquecendo a monitorização laboratorial de ambas as formas.

Vários estudos, mesmo em pacientes em hemodiálise, demonstraram que a suplementação com vitamina 25(OH)D corrige a deficiência em vitamina D sem evidência de toxicidade (112, 118). Dada a evidência da sua insuficiência e da presença VDR no organismo em diversos tecidos, sugere a sua participação noutros processos fisiológicos para além da atividade específica sobre o metabolismo mineral e a prevenção do raquitismo/osteomalacia, como seja a regulação da expressão de proteínas envolvidas na resposta celular, produzindo, assim, múltiplas respostas biológicas (42, 43). A suplementação é suficiente para reduzir parâmetros inflamatórios, como os níveis de IL-8, TNF α e a PCR, com redução do consumo de agente estimulante da eritropoiese; diminuir a proteinúria; aumentar o controlo do metabolismo mineral com menos uso de vitamina D ativa, e melhorar a disfunção cardíaca (94, 112, 119-121). Estes efeitos podem ser relacionados com a ação direta da vitamina 25(OH)D em células alvo e ou a persistência 1 α -hidroxilação renal e extra-renal (112, 121).

Sendo fundamental para as crianças com DRC, a suplementação com 1,25(OH)₂D, faz-se com o objetivo de evitar o aumento da PTH (13, 111), e permite que tanto aos doentes em diálise como aos em pré-diálise, terem um melhor crescimento e desenvolvimento (91, 97, 117), apesar de ter maiores riscos de toxicidade, pois pode levar a um aumento do nível plasmático de fósforo e cálcio o que agravaria a DRC (122, 123). A *European Society for Paediatric Endocrinology* recomenda a suplementação diária de 400 IU de calciferol para todas as crianças em idade pré-escolar (124), é recomendada suplementação com vitamina 25(OH)D em pacientes com valores <30 ng/mL, para prevenir ou atenuar o hiperparatiroidismo secundário e osteomalacia (11). Esta suplementação é simples, aparentemente segura e rentável. Mais importante, ela parece ser um tratamento que potencialmente, melhora os resultados clínicos, embora os efeitos sobre a morbidade e mortalidade ainda precisem de ser confirmados em estudos de acompanhamento randomizado controlado, e mais longos.

5 Conclusão

Em resumo, mais de três quartos (85%) dos participantes neste estudo apresentavam deficiência em vitamina 25(OH)D e cerca de 17% apresentava valores abaixo de 25 pg/mL, o que está abaixo do considerado normal. A correção destes valores de vitamina D desde as mais precoces idades pediátricas poderá constituir uma das mais importantes medidas de saúde pública preventiva permitindo contribuir para melhorar assistência a criança portadoras de DR. Há que relembrar que a terapia com vitamina D não tem custos elevados, a sua janela terapêutica é relativamente grande permitindo uma administração segura, e os efeitos terapêuticos são bastante amplos.

Salientar que no que diz respeito à vitamina 1,25(OH)₂D a média de valores obtida é considerada normal, no entanto em 17% da amostra, obtivemos valores abaixo de 25 pg/mL, seria de ponderar se seria útil o seu doseamento para monitorizar a terapêutica, nos indivíduos com IRC.

Dentro da DR, a IRC é uma condição potencialmente fatal que não se cura, o objetivo a longo prazo dos cuidados de saúde de crianças com IRC é promover espaço de vida o mais longo possível com morbidade mínima e oportunidade para o desenvolvimento e crescimento próximos ao desejado. Todas as informações que possam dar a conhecer verdadeiramente a situação destas crianças ajudam nesse sentido, e foi com esse objetivo que este estudo foi realizado.

6 Bibliografia

1. Pereira F, Almeida MDVd. Vitamina D: uma verdadeira hormona. 2008.
2. Holick MF. Vitamin D: a D-Lightful health perspective. *Nutrition reviews*. 2008;66(10 Suppl 2):S182-94. Epub 2008/12/05.
3. Norman AW. From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. *The American journal of clinical nutrition*. 2008;88(2):491S-9S.
4. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D2005 2005-07-01 00:00:00. F8-F28 p.
5. Wierzbicka J, Piotrowska A, Zmijewski MA. The renaissance of vitamin D. *Acta biochimica Polonica*. 2014;61(4):679-86. Epub 2015/01/08.
6. Mangin M, Sinha R, Fincher K. Inflammation and vitamin D: the infection connection. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]*. 2014;63(10):803-19. Epub 2014/07/23.
7. Shanmugalingam T, Crawley D, Bosco C, Melvin J, Rohrmann S, Chowdhury S, et al. Obesity and cancer: the role of vitamin D. *BMC cancer*. 2014;14:712. Epub 2014/09/27.
8. Bikle D. Nonclassic actions of vitamin D. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2009;94(1):26-34. Epub 2008/10/16.
9. Gombart AF. The vitamin D-antimicrobial peptide pathway and its role in protection against infection. *Future microbiology*. 2009;4(9):1151-65. Epub 2009/11/10.
10. Hu P, Hu B, Wang J, Lu L, Qin YH. Modulation of vitamin D signaling is a potential therapeutic target to lower cardiovascular risk in chronic kidney disease. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*. 2011;17(6):HY14-20. Epub 2011/06/02.
11. Misra M, Pacaud D, Petryk A, Collett-Solberg PF, Kappy M. Vitamin D deficiency in children and its management: review of current knowledge and recommendations. *Pediatrics*. 2008;122(2):398-417. Epub 2008/08/05.
12. Bikle DD. Vitamin D Metabolism, Mechanism of Action, and Clinical Applications. *Chemistry & Biology*. 2014;21(3):319-29.
13. Tsiaras WG, Weinstock MA. Factors influencing vitamin D status. *Acta dermato-venereologica*. 2011;91(2):115-24. Epub 2011/03/09.
14. Perwad F, Portale AA. Vitamin D metabolism in the kidney: Regulation by phosphorus and fibroblast growth factor 23. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2011;347(1-2):17-24.
15. Henry HL. Regulation of vitamin D metabolism. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*. 2011;25(4):531-41. Epub 2011/08/30.
16. Castro LCGd. O sistema endocrinológico vitamina D. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2011;55:566-75.
17. Touvier M, Deschasaux M, Montourcy M, Sutton A, Charnaux N, Kesse-Guyot E, et al. Determinants of vitamin D status in Caucasian adults: influence of sun exposure, dietary intake, sociodemographic, lifestyle, anthropometric, and genetic factors. *The Journal of investigative dermatology*. 2015;135(2):378-88. Epub 2014/09/12.
18. Schuster I. Cytochromes P450 are essential players in the vitamin D signaling system. *Biochimica et biophysica acta*. 2011;1814(1):186-99. Epub 2010/07/14.
19. Battault S, Whiting SJ, Peltier SL, Sadrin S, Gerber G, Maixent JM. Vitamin D metabolism, functions and needs: from science to health claims. *Eur J Nutr*. 2013;52(2):429-41.
20. Blum M, Dolnikowski G, Seyoun E, Harris SS, Booth SL, Peterson J, et al. Vitamin D(3) in fat tissue. *Endocrine*. 2008;33(1):90-4. Epub 2008/03/14.
21. Al Mutair AN, Nasrat GH, Russell DW. Mutation of the CYP2R1 Vitamin D 25-Hydroxylase in a Saudi Arabian Family with Severe Vitamin D Deficiency. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2012;97(10):E2022-E5.
22. Nowak A, Boesch L, Andres E, Battagay E, Hornemann T, Schmid C, et al. Effect of vitamin D3 on self-perceived fatigue: A double-blind randomized placebo-controlled trial. *Medicine*. 2016;95(52):e5353.
23. Nielsen NO, Bjerregaard P, Rønn PF, Friis H, Andersen S, Melbye M, et al. Associations between Vitamin D Status and Type 2 Diabetes Measures among Inuit in Greenland May Be Affected by Other Factors. *PloS one*. 2016;11(4):e0152763.
24. McDonnell SL, Baggerly C, French CB, Baggerly LL, Garland CF, Gorham ED, et al. Serum 25-Hydroxyvitamin D Concentrations ≥ 40 ng/ml Are Associated with $>65\%$ Lower Cancer Risk: Pooled Analysis of Randomized Trial and Prospective Cohort Study. *PloS one*. 2016;11(4):e0152441.

25. Musselwhite LW, Andrade BB, Ellenberg SS, Tierney A, Belaunzaran-Zamudio PF, Rupert A, et al. Vitamin D, d-dimer, Interferon γ , and sCD14 Levels are Independently Associated with Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome: A Prospective, International Study(). *EBioMedicine*. 2016;4:115-23.
26. Bellan M, Guzzaloni G, Rinaldi M, Merlotti E, Ferrari C, Tagliaferri A, et al. Altered glucose metabolism rather than naive type 2 diabetes mellitus (T2DM) is related to vitamin D status in severe obesity. *Cardiovascular diabetology*. 2014;13:57. Epub 2014/03/13.
27. Manghat P, Fraser W, Wierzbicki A, Fogelman I, Goldsmith D, Hampson G. Fibroblast growth factor-23 is associated with C-reactive protein, serum phosphate and bone mineral density in chronic kidney disease. *Osteoporosis international*. 2010;21(11):1853-61.
28. Vimalaswaran KS, Berry DJ, Lu C, Tikkanen E, Pilz S, Hiraki LT, et al. Causal relationship between obesity and vitamin D status: bi-directional Mendelian randomization analysis of multiple cohorts. *PLoS medicine*. 2013;10(2):e1001383. Epub 2013/02/09.
29. Al-Daghri NM, Guerini FR, Al-Attas OS, Alokail MS, Alkharfy KM, Draz HM, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms are associated with obesity and inflammosomal activity. *PloS one*. 2014;9(7):e102141. Epub 2014/07/16.
30. Alves M, Bastos M, Leitão F, Marques G, Ribeiro G, Carrilho F. Vitamina D—importância da avaliação laboratorial. *Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo*. 2013;8(1):32-9.
31. Speeckaert MM, Speeckaert R, van Geel N. Vitamin D Binding. *Advances in clinical chemistry*. 2013;63:1.
32. Chun RF, Peercy BE, Orwoll ES, Nielson CM, Adams JS, Hewison M. Vitamin D and DBP: The free hormone hypothesis revisited. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2014;144PA:132-7.
33. Brown AJ, Coyne DW. Bioavailable vitamin D in chronic kidney disease. *Kidney international*. 2012;82(1):5-7. Epub 2012/06/16.
34. Bienaimé F, Prié D, Friedlander G, Souberbielle JC. Vitamin D metabolism and activity in the parathyroid gland. *Mol Cell Endocrinol*. 2011;347(1-2):30-41.
35. Christensen EI, Birn H, Storm T, Weyer K, Nielsen R. Endocytic Receptors in the Renal Proximal Tubule. *2012-08-01 00:00:00*. 223-36 p.
36. Clinical utility of vitamin d testing: an evidence-based analysis. *Ontario health technology assessment series*. 2010;10(2):1-93. Epub 2010/01/01.
37. Anand S, Chertow GM, Johansen KL, Grimes B, Dalrymple LS, Kaysen GA, et al. Vitamin D deficiency and mortality in patients receiving dialysis: the Comprehensive Dialysis Study. *Journal of renal nutrition : the official journal of the Council on Renal Nutrition of the National Kidney Foundation*. 2013;23(6):422-7. Epub 2013/07/24.
38. Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, van Etten E, Verstuyf A, Luderer HF, et al. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocrine Reviews*. 2008;29(6):726-76.
39. Carlberg C, Campbell MJ. Vitamin D receptor signaling mechanisms: Integrated actions of a well-defined transcription factor. *Steroids*. 2013;78(2):127-36.
40. Wang Y, Zhu J, DeLuca HF. Where is the vitamin D receptor? *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2012;523(1):123-33.
41. Haussler MR, Haussler CA, Bartik L, Whitfield GK, Hsieh J-C, Slater S, et al. Vitamin D receptor: molecular signaling and actions of nutritional ligands in disease prevention. *Nutrition reviews*. 2008;66(suppl 2):S98-S112.
42. Wang Y, Zhu J, DeLuca HF. Where is the vitamin D receptor? *Archives of biochemistry and biophysics*. 2012;523(1):123-33. Epub 2012/04/17.
43. Haussler MR, Jurutka PW, Mizwicki M, Norman AW. Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of 1 α , 25 (OH) 2 vitamin D 3: genomic and non-genomic mechanisms. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2011;25(4):543-59.
44. Hii CS, Ferrante A. The non-genomic actions of vitamin D. *Nutrients*. 2016;8(3):135.
45. Carlberg C, Campbell MJ. Vitamin D receptor signaling mechanisms: integrated actions of a well-defined transcription factor. *Steroids*. 2013;78(2):127-36. Epub 2012/11/28.
46. Haussler M, Whitfield GK, Kaneko I, Haussler C, Hsieh D, Hsieh J-C, et al. Molecular Mechanisms of Vitamin D Action. *Calcified tissue international*. 2013;92(2):77-98.
47. McKenna NJ, O'Malley BW. Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell*. 2002;108(4):465-74. Epub 2002/03/23.
48. Haussler MR, Jurutka PW, Mizwicki M, Norman AW. Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of 1 α , 25(OH)₂ vitamin D₃: Genomic and non-genomic mechanisms. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 25(4):543-59.

49. Kumar R, Tebben PJ, Thompson JR. Vitamin D and the kidney. *Arch Biochem Biophys*. 2012;523(1):77-86. Epub 2012/03/20.
50. Feldman D, J Malloy P. Mutations in the vitamin D receptor and hereditary vitamin D-resistant rickets. *BoneKEy reports*. 2014;3:510.
51. Danziger J, Zeidel M, Parker MJ. *Renal physiology: a clinical approach*: Lippincott Williams & Wilkins; 2011.
52. Coelho TH, Moreira Al. *Fisiologia Renal [Texto Apoio]*. Universidade de medicina do Porto. Available from: <http://pt.slideshare.net/MagaliBarros1/fisiologia-renal-fmup>.
53. Staruschenko A. Regulation of transport in the connecting tubule and cortical collecting duct. *Comprehensive Physiology*. 2012;2:1541-84.
54. Firsov D, Tokonami N, Bonny O. Role of the renal circadian timing system in maintaining water and electrolytes homeostasis. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2012;349(1):51-5.
55. OpenStax. *The Kidneys and Osmoregulatory Organs*. OpenStax, OpenStax Biology; 2012 [updated 26/06/2013]; 23/08/2012: Available from: <https://cnx.org/contents/PixBa--0@7/The-Kidneys-and-Osmoregulatory>.
56. Hoenig MP, Zeidel ML. Homeostasis, the Milieu Intérieur, and the Wisdom of the Nephron. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2014;9(7):1272-81.
57. Ayus JC, Caramelo C. *Agua, electrolitos y equilibrio ácido-base*: Ed. Médica Panamericana; 2006.
58. Noda M, Sakuta H. Central regulation of body-fluid homeostasis. *Trends in neurosciences*. 2013;36(11):661-73.
59. Damkjær M, Isaksson G, Stubbe J, Jensen B, Assersen K, Bie P. Renal renin secretion as regulator of body fluid homeostasis. *Pflugers Arch - Eur J Physiol*. 2013;465(1):153-65.
60. Sawka MN, Chevront SN, Carter R. Human Water Needs. *Nutrition reviews*. 2005;63(6):30-9.
61. Bianchetti MG, Simonetti GD, Bettinelli A. Body fluids and salt metabolism-Part I. *Ital J Pediatr*. 2009;35(1):36.
62. Antunes-Rodrigues J, Picanço-Diniz D, Valença M, McCann S. Controle neuroendócrino da homeostase dos fluidos corporais. *Neuroendocrinologia Básica e Aplicada*, eds Antunes-Rodrigues J, Moreira AC, Elias LLK, & Castro M Editora Guanabara Koogan SA, Rio de Janeiro. 2005:81-115.
63. Agrawal V, Agarwal M, Joshi SR, Ghosh AK. Hyponatremia and hypernatremia: disorders of water balance. *The Journal of the Association of Physicians of India*. 2008;56:956-64. Epub 2009/03/28.
64. POC P. *Controle Endócrino do Equilíbrio Hidro-eletrolítico Equilíbrio hidro-eletrolítico*. 2009.
65. Brown D, Bouley R, Paunescu TG, Breton S, Lu HA. New insights into the dynamic regulation of water and acid-base balance by renal epithelial cells. *American journal of physiology Cell physiology*. 2012;302(10):C1421-33. Epub 2012/03/31.
66. Etelvino G, Peluso A, Santos R. New Components of the Renin-Angiotensin System: Alamandine and the Mas-Related G Protein-Coupled Receptor D. *Curr Hypertens Rep*. 2014;16(6):1-6.
67. Bernstein KE, Giani JF, Shen XZ, Gonzalez-Villalobos RA. Renal angiotensin-converting enzyme and blood pressure control. *Current opinion in nephrology and hypertension*. 2014;23(2):106-12. Epub 2014/01/01.
68. Fyhrquist F, Saijonmaa O. Renin-angiotensin system revisited. *Journal of internal medicine*. 2008;264(3):224-36. Epub 2008/09/17.
69. Hoenig MP, Zeidel ML. Homeostasis, the milieu interieur, and the wisdom of the nephron. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2014;9(7):1272-81. Epub 2014/05/03.
70. POC P. *CONTROLE ENDÓCRINO DO EQUILÍBRIO HIDRO-ELETROLÍTICO Equilíbrio hidro-eletrolítico*. 2009.
71. Silverthorn DU. *Human Physiology 7 th ed*. Silverthorn Art Chapter 19: Pearson Education; 2016.
72. Haussler MR, Whitfield GK, Kaneko I, Haussler CA, Hsieh D, Hsieh JC, et al. Molecular mechanisms of vitamin D action. *Calcified tissue international*. 2013;92(2):77-98. Epub 2012/07/12.
73. Chau Y-Y, Kumar J. Vitamin D in Chronic Kidney Disease. *Indian journal of pediatrics*. 2012;79(8):1062-8.
74. Alexander Pico CE, Lucia Riberio, Martijn van Iersel, Kristina Hanspers. Graphical description of Vitamin D Synthesis in humans. <http://www.wikipathways.org/index.php/Pathway:WP1531> 2010.
75. Kim CS, Kim SW. Vitamin D and chronic kidney disease. *The Korean journal of internal medicine*. 2014;29(4):416-27. Epub 2014/07/22.
76. Baum M. Overview of chronic kidney disease in children. *Current opinion in pediatrics*. 2010;22(2):158-60. Epub 2010/03/20.

77. Trapote RA, Ibanez MS, Navarro M. Epidemiology of chronic kidney disease in Spanish pediatric population. REPIR II Project. *Nefrologia : publicacion oficial de la Sociedad Espanola Nefrologia*. 2010;30(5):508-17.
78. Harambat J, van Stralen KJ, Schaefer F, Grenda R, Jankauskiene A, Kostic M, et al. Disparities in policies, practices and rates of pediatric kidney transplantation in Europe. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2013;13(8):2066-74. Epub 2013/05/31.
79. Coelho A, Diniz A, Hartz Z, Dussault G. Gestão integrada da doença renal crónica: análise de uma política inovadora em Portugal. *Revista Portuguesa de Saúde Pública*. 2014;32(1):69-79.
80. Chesnaye N, Bonthuis M, Schaefer F, Groothoff JW, Verrina E, Heaf JG, et al. Demographics of paediatric renal replacement therapy in Europe: a report of the ESPN/ERA-EDTA registry. *Pediatr Nephrol*. 2014;29(12):2403-10. Epub 2014/07/21.
81. ERA-EDTA Registry Annual Report 2013. 2015. Academic Medical Center, Department of Medical Informatics.
82. Harambat J, van Stralen KJ, Kim JJ, Tizard EJ. Epidemiology of chronic kidney disease in children. *Pediatr Nephrol*. 2012;27(3):363-73. Epub 2011/06/30.
83. Slee AD. Exploring metabolic dysfunction in chronic kidney disease. *Nutrition & metabolism*. 2012;9(1):36. Epub 2012/04/28.
84. Staples A, Wong C. Risk factors for progression of chronic kidney disease. *Current opinion in pediatrics*. 2010;22(2):161-9. Epub 2010/01/22.
85. Querfeld U. Vitamin D and inflammation. *Pediatr Nephrol*. 2013;28(4):605-10. Epub 2012/12/15.
86. Jung YJ, Lee HR, Kwon OJ. Comparison of serum cystatin C and creatinine as a marker for early detection of decreasing glomerular filtration rate in renal transplants. *Journal of the Korean Surgical Society*. 2012;83(2):69-74. Epub 2012/08/11.
87. Santos J, Martins LS. Estimating glomerular filtration rate in kidney transplantation: Still searching for the best marker. *World Journal of Nephrology*. 2015;4(3):345-53.
88. Schwartz GJ, Work DF. Measurement and estimation of GFR in children and adolescents. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2009;4(11):1832-43. Epub 2009/10/13.
89. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Official Journal of the International Society of Nephrology* 2013.
90. Areses Trapote R, Sanahuja Ibanez MJ, Navarro M. [Epidemiology of chronic kidney disease in Spanish pediatric population. REPIR II Project]. *Nefrologia : publicacion oficial de la Sociedad Espanola Nefrologia*. 2010;30(5):508-17. Epub 2010/07/09. Epidemiologia de la enfermedad renal cronica no terminal en la poblacion pediatrica espanola. Proyecto REPIR II.
91. Bacchetta J, Harambat J, Cochat P, Salusky IB, Wesseling-Perry K. The consequences of chronic kidney disease on bone metabolism and growth in children. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2012;27(8):3063-71. Epub 2012/08/02.
92. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, et al. Evaluation, Treatment, and Prevention of Vitamin D Deficiency: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2011;96(7):1911-30.
93. Chonchol M, Kendrick J, Targher G. Extra-skeletal effects of vitamin D deficiency in chronic kidney disease. *Annals of medicine*. 2011;43(4):273-82. Epub 2011/01/11.
94. Dusso A, Gonzalez EA, Martin KJ. Vitamin D in chronic kidney disease. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*. 2011;25(4):647-55. Epub 2011/08/30.
95. Yuste C, Barraca D, Aragoncillo-Sauco I, Vega-Martinez A, Abad S, Verdalles-Guzman U, et al. Factors related with the progression of chronic kidney disease. *Nefrologia : publicacion oficial de la Sociedad Espanola Nefrologia*. 2013;33(5):685-91. Epub 2013/10/04.
96. Levin A, Le Barbier M, Er L, Andress D, Sigrist MK, Djurdjev O. Incident isolated 1,25(OH)(2)D(3) deficiency is more common than 25(OH)D deficiency in CKD. *Journal of nephrology*. 2012;25(2):204-10. Epub 2011/06/21.
97. Pilz S, Tomaschitz A, Friedl C, Amrein K, Drechsler C, Ritz E, et al. Vitamin D status and mortality in chronic kidney disease. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2011;26(11):3603-9. Epub 2011/03/08.
98. Ala-Houhala MJ, Vahavihu K, Hasan T, Kautiainen H, Snellman E, Karisola P, et al. Narrow-band ultraviolet B exposure increases serum vitamin D levels in haemodialysis patients. *Nephrology, dialysis,*

transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association. 2012;27(6):2435-40. Epub 2011/12/20.

99. Denburg MR, Kalkwarf HJ, de Boer IH, Hewison M, Shults J, Zemel BS, et al. Vitamin D bioavailability and catabolism in pediatric chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol.* 2013;28(9):1843-53. Epub 2013/06/04.

100. Czyzewski L, Sanko-Resmer J, Wyzgal J, Kurowski A. Assessment of health-related quality of life of patients after kidney transplantation in comparison with hemodialysis and peritoneal dialysis. *Annals of transplantation : quarterly of the Polish Transplantation Society.* 2014;19:576-85. Epub 2014/11/11.

101. Chaudhary K, Sangha H, Khanna R. Peritoneal dialysis first: rationale. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology.* 2011;6(2):447-56.

102. Dalal P, Sangha H, Chaudhary K. In Peritoneal Dialysis, Is There Sufficient Evidence to Make "PD First" Therapy? *Int J Nephrol.* 2011;2011:239515.

103. Holick MF. Vitamin D status: measurement, interpretation, and clinical application. *Annals of epidemiology.* 2009;19(2):73-8. Epub 2008/03/11.

104. Anand S, Kaysen GA, Chertow GM, Johansen KL, Grimes B, Dalrymple LS, et al. Vitamin D deficiency, self-reported physical activity and health-related quality of life: the Comprehensive Dialysis Study. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association.* 2011;26(11):3683-8. Epub 2011/03/25.

105. Valtuena J, Gonzalez-Gross M, Huybrechts I, Breidenassel C, Ferrari M, Mouratidou T, et al. Factors associated with vitamin D deficiency in European adolescents: the HELENA study. *Journal of nutritional science and vitaminology.* 2013;59(3):161-71. Epub 2013/07/26.

106. Kalkwarf HJ, Denburg MR, Strife CF, Zemel BS, Foerster DL, Wetzsteon RJ, et al. Vitamin D deficiency is common in children and adolescents with chronic kidney disease. *Kidney international.* 2012;81(7):690-7. Epub 2011/12/30.

107. Vierucci F, Del Pistoia M, Fanos M, Erba P, Saggese G. Prevalence of hypovitaminosis D and predictors of vitamin D status in Italian healthy adolescents. *Ital J Pediatr.* 2014;40:54. Epub 2014/06/07.

108. The National Kidney Foundation Kidney Disease Outcomes Quality Initiative-KDOQI Guidelines and Commentaries. New York: © 2017 National Kidney Foundation, Inc., 30 East 33rd Street, New York, NY 10016, 1-800-622-9010; Available from: <https://www.kidney.org/professionals/guidelines>.

109. Inker LA, Astor BC, Fox CH, Isakova T, Lash JP, Peralta CA, et al. KDOQI US Commentary on the 2012 KDIGO Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of CKD. *American Journal of Kidney Diseases.* 63(5):713-35.

110. Lips P. Relative Value of 25(OH)D and 1,25(OH)2D Measurements. *Journal of Bone and Mineral Research.* 2007;22(11):1668-71.

111. Chun RF, Peercy BE, Orwoll ES, Nielson CM, Adams JS, Hewison M. Vitamin D and DBP: the free hormone hypothesis revisited. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology.* 2014;144:132-7.

112. Matias PJ, Jorge C, Ferreira C, Borges M, Aires I, Amaral T, et al. Cholecalciferol Supplementation in Hemodialysis Patients: Effects on Mineral Metabolism, Inflammation, and Cardiac Dimension Parameters. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology.* 2010:CJN. 06510909.

113. Bosworth CR, Levin G, Robinson-Cohen C, Hoofnagle AN, Ruzinski J, Young B, et al. The serum 24,25-dihydroxyvitamin D concentration, a marker of vitamin D catabolism, is reduced in chronic kidney disease. *Kidney international.* 2012;82(6):693-700. Epub 2012/06/01.

114. Metzger M, Houillier P, Gauci C, Haymann JP, Flamant M, Thervet E, et al. Relation between circulating levels of 25(OH) vitamin D and parathyroid hormone in chronic kidney disease: quest for a threshold. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2013;98(7):2922-8. Epub 2013/05/02.

115. Touvier M, Deschasaux M, Montourcy M, Sutton A, Charnaux N, Kesse-Guyot E, et al. Interpretation of plasma PTH concentrations according to 25OHD status, gender, age, weight status, and calcium intake: importance of the reference values. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2014;99(4):1196-203. Epub 2014/02/18.

116. Valcour A, Blocki F, Hawkins DM, Rao SD. Effects of age and serum 25-OH-vitamin D on serum parathyroid hormone levels. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2012;97(11):3989-95. Epub 2012/08/31.

117. Melamed ML, Thadhani RI. Vitamin D therapy in chronic kidney disease and end stage renal disease. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN.* 2012;7(2):358-65. Epub 2011/12/24.

118. Shah VN, Shah CS, Bhadada SK, Rao DS. Effect of 25 (OH) D replacements in patients with primary hyperparathyroidism (PHPT) and coexistent vitamin D deficiency on serum 25(OH) D, calcium and

PTH levels: a meta-analysis and review of literature. *Clinical endocrinology*. 2014;80(6):797-803. Epub 2014/01/03.

119. Stubbs JR, Idiculla A, Slusser J, Menard R, Quarles LD. Cholecalciferol supplementation alters calcitriol-responsive monocyte proteins and decreases inflammatory cytokines in ESRD. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2010;21(2):353-61. Epub 2009/12/17.

120. Trautvetter U, Neef N, Leiterer M, Kiehntopf M, Kratzsch J, Jahreis G. Effect of calcium phosphate and vitamin D(3) supplementation on bone remodelling and metabolism of calcium, phosphorus, magnesium and iron. *Nutrition journal*. 2014;13:6-.

121. Molina P, Gorriz JL, Molina MD, Peris A, Beltran S, Kanter J, et al. The effect of cholecalciferol for lowering albuminuria in chronic kidney disease: a prospective controlled study. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2014;29(1):97-109. Epub 2013/08/27.

122. Colussi G, Ganon L, Penco S, De Ferrari ME, Ravera F, Querques M, et al. Chronic hypercalcaemia from inactivating mutations of vitamin D 24-hydroxylase (CYP24A1): implications for mineral metabolism changes in chronic renal failure. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2014;29(3):636-43. Epub 2013/11/16.

123. Figueres ML, Linglart A, Bienaime F, Allain-Launay E, Roussey-Kessler G, Ryckewaert A, et al. Kidney Function and Influence of Sunlight Exposure in Patients With Impaired 24-Hydroxylation of Vitamin D Due to CYP24A1 Mutations. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 2015;65(1):122-6. Epub 2014/12/03.

124. Pearce SH, Cheetham TD. Diagnosis and management of vitamin D deficiency. *BMJ*. 2010;340:b5664. Epub 2010/01/13.